Tämä asiakirja on ainoastaan dokumentointitarkoituksiin. Toimielimet eivät vastaa sen sisällöstä.

►**B** ►**C1** **KOMISSION ASETUS (EY) N:o 440/2008,**

annettu 30 päivänä toukokuuta 2008,

testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla ◄

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

(EUVL L 142, 31.5.2008, s. 1)

sellaisena kuin se on muutettuna seuraavilla:

		virallinen lehti		
		N:o	sivu	päivämäärä
►**M1**	Komission asetus (EY) N:o 761/2009, annettu 23 päivänä heinäkuuta 2009	L 220	1	24.8.2009
►**M2**	Komission asetus (EU) N:o 1152/2010, annettu 8 päivänä joulukuuta 2010	L 324	13	9.12.2010
►**M3**	Komission asetus (EU) N:o 640/2012, annettu 6 päivänä heinäkuuta 2012	L 193	1	20.7.2012
►**M4**	Komission asetus (EU) N:o 260/2014, annettu 24 päivänä tammikuuta 2014	L 81	1	19.3.2014

Oikaistu:

►**C1** Oikaisu, EUVL L 151, 10.6.2011, s. 15 (440/2008)

▼B

►C1 KOMISSION ASETUS (EY) N:o 440/2008,

annettu 30 päivänä toukokuuta 2008,

testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla ◄

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta 18 päivänä joulukuuta 2006 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 ([1]) ja erityisesti sen 13 artiklan 3 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Aineiden sisäisten ominaisuuksien selvittämiseksi käytettävät testimenetelmät on asetuksen (EY) N:o 1907/2006 mukaisesti hyväksyttävä yhteisön tasolla.

(2) Vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä 27 päivänä kesäkuuta 1967 annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY ([2]) liitteessä V säädetään aineiden ja valmisteiden fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, myrkyllisyyden ja ekomyrkyllisyyden määritysmenetelmistä. Direktiivin 67/548/ETY liite V on kumottu Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivillä 2006/121/EY 1 päivästä kesäkuuta 2008 alkaen.

(3) Direktiivin 67/548/ETY liitteessä V olevat testimenetelmät olisi sisällytettävä tähän asetukseen.

(4) Tämä asetus ei rajoita muiden testimenetelmien käyttämistä, jos niitä käytetään asetuksen (EY) N:o 1907/2006 13 artiklan 3 kohdan mukaisesti.

([1]) EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1, oikaisu EUVL L 136, 29.5.2007, s. 3.

([2]) EYVL 196, 16.8.1967, s. 1, direktiivi sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivillä 2006/121/EY (EUVL L 396, 30.12.2006, s. 850, oikaisu EUVL L 136, 29.5.2007, s. 281) — *täydennetään asianmukaisella viitteellä, kun 30. ATP on julkaistu.*

▼B

(5) Testimenetelmien suunnittelussa olisi otettava täysimääräisesti huomioon eläinkokeiden korvaamista, vähentämistä sekä niihin liittyvien menetelmien parantamista koskevat periaatteet, erityisesti jos saataville tulee asianmukaisia validoituja menetelmiä, joilla voidaan korvata eläinkokeita, vähentää niiden käyttöä tai parantaa menetelmiä.

(6) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat asetuksen (EY) N:o 1907/2006 133 artiklalla perustetun komitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Asetuksen (EY) N:o 1907/2006/EY soveltamiseksi käytettävät testimenetelmät vahvistetaan tämän asetuksen liitteessä.

2 artikla

Komissio tarkastelee tarvittaessa uudelleen tässä asetuksessa mainittuja testimenetelmiä, jos niitä on tarpeen muuttaa selkärankaisilla eläimillä tehtävien kokeiden korvaamiseksi, vähentämiseksi ja menetelmien parantamiseksi.

3 artikla

Viittauksia direktiivin 67/548/ETY liitteeseen V pidetään viittauksina tähän asetukseen.

4 artikla

Tämä asetus tulee voimaan seuraavana päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä.*

Sitä sovelletaan 1 päivästä kesäkuuta 2008.

▼B

LIITE

OSA A: FYSIKAALIS-KEMIALLISTEN OMINAISUUKSIEN MÄÄRITYSMENETELMÄT

SISÄLLYSLUETTELO

A.1	SULAMIS-/JÄÄTYMISLÄMPÖTILA
A.2	KIEHUMISLÄMPÖTILA
A.3	SUHTEELLINEN TIHEYS
A.4	HÖYRYNPAINE
A.5	PINTAJÄNNITYS
A.6	VESILIUKOISUUS
A.8	JAKAANTUMISKERROIN
A.9	LEIMAHDUSPISTE
A.10	SYTTYVYYS (KIINTEÄT AINEET)
A.11	SYTTYVYYS (KAASUT)
A.12	SYTTYVYYS (KOSKETUS VEDEN KANSSA)
A.13	KIINTEIDEN AINEIDEN JA NESTEIDEN ITSESYTTYVYYS
A.14	RÄJÄHTÄVYYS
A.15	ITSESYTTYMISLÄMPÖTILA (NESTEET JA KAASUT)
A.16	KIINTEIDEN AINEIDEN SUHTEELLINEN ITSESYTTYMIS-LÄMPÖTILA
A.17	HAPETTAVAT OMINAISUUDET (KIINTEÄT AINEET)
A.18	POLYMEERIEN LUKUKESKIMÄÄRÄINEN MOLEKYY-LIPAINO JA MOLEKYYLIPAINOJAKAUMA
A.19	PIENIMOLEKYYLISTEN AINEIDEN PITOISUUS POLYMEE-RISSÄ
A.20	VESILIUOKSESSA OLEVIEN POLYMEERIEN LIUKENE-MIS/UUTTUMISOMINAISUUDET
A.21	HAPETTAVAT OMINAISUUDET (NESTEET)
A.22.	KUITUJEN HALKAISIJAN PITUUSPAINOTETTU GEOMET-RINEN KESKIARVO

▼M4

A.23.	JAKAANTUMISKERROIN (1-OKTANOLI-VESI): HITAAN SEKOITUKSEN MENETELMÄ

▼B

A.1 SULAMIS-/JÄÄTYMISLÄMPÖTILA

1. MENETELMÄ

Tässä kuvattavat menetelmät perustuvat pääosin OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteissä (2) ja (3).

1.1 JOHDANTO

Kuvattuja menetelmiä ja laitteita voidaan soveltaa aineiden sulamislämpötilan määritykseen ilman rajoituksia aineiden puhtausasteen suhteen.

Sopiva menetelmä valitaan testattavan aineen luonteen mukaan. Aineet voivat olla helposti, vaikeasti tai ei lainkaan jauhettavissa.

Joidenkin aineiden kohdalla on käytännöllisempää määrittää jäätymis- tai jähmettymislämpötila, ja tästä syystä menetelmään on myös otettu mukaan tällaisten määritysten standardit.

Jos aineen ominaisuudet ovat sellaiset, että mikään edellä mainituista parametreista ei ole mitattavissa, voidaan joissakin tapauksissa käyttää jähmettymispistettä.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan sulamislämpötila on se lämpötila, jossa tapahtuu faasimuutos kiinteästä olomuodosta nestemäiseen olomuotoon ilmakehän paineessa. Ihannetapauksissa sulamislämpötila on sama kuin jäätymislämpötila.

Koska faasimuutos kattaa usein määrätyn lämpötila-alueen, voidaan käyttää myös käsitettä sulamisalue.

Yksiköiden muuntaminen (K > °C)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius-lämpötila, Celsius-astetta (°C)

T: termodynaaminen lämpötila, kelviniä (K)

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

Viitteessä (4) kuvataan joitakin kalibrointiaineita.

▼B

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATTEET

Määritetään lämpötila (lämpötila-alue), jossa tapahtuu faasimuutos kiinteästä olomuodosta nestemäiseen olomuotoon tai päinvastoin. Käytännössä määritetään sulamisen tai jäätymisen alku- ja loppulämpötila kuumennettaessa tai jäähdytettäessä näytettä ilmakehän paineessa. Jäljempänä kuvataan viisi menetelmätyyppiä: kapillaarimenetelmä, kuuma-alustamenetelmät, jäätymislämpötilan määritykset, terminen analyysi ja jähmettymispisteen määritys (kehitetty paloöljyjä varten).

Joissakin tapauksissa voi olla käytännöllisempää määrittää sulamislämpötilan sijasta jäätymislämpötila.

1.4.1 **Kapillaarimenetelmä**

1.4.1.1 *Nestehauteella varustetut sulamislämpötilalaitteet*

Pieni määrä hienoksi jauhettua näytettä pakataan tiiviisti kapillaariputkeen. Putkea kuumennetaan yhdessä lämpömittarin kanssa siten, että lämpötilan nousu on alle 1 K minuutissa varsinaisen sulamisen aikana. Määritetään sulamisen alku- ja loppulämpötila.

1.4.1.2 *Metallikappaleeseen perustuvat sulamislämpötilalaitteet*

Periaate on muutoin sama kuin kohdassa 1.4.1.1, mutta kapillaariputki ja lämpömittari asetetaan kuumennettavaan metallikappaleeseen, jossa on reiät niiden tarkastelua varten.

1.4.1.3 *Valokennoilmaisin*

Kapillaariputkessa olevaa näytettä kuumennetaan metallisylinterissä automaattisesti. Aineen läpi johdetaan valonsäde sylinterin reiän kautta tarkasti kalibroituun valokennoon. Digitaalisesta osoittimesta nähdään kuumennuskammiossa sijaitsevan platinavastuslämpömittarin mittaama lämpötila. Useimpien aineiden optiset ominaisuudet muuttuvat sulamisen myötä valoaläpäisemättömäksi läpinäkyvään, jolloin valokennoon tulevan valonsäteen intensiteetti kasvaa ja digitaalinen osoitin saa pysäytyssignaalin. Menetelmä ei sovellu voimakkaanväristen aineiden mittauksiin.

1.4.2 **Kuuma-alustamenetelmät**

1.4.2.1 *Koflerin kuumasauva*

Koflerin kuumasauvassa on kaksi metalliosaa, joilla on eri lämmönjohtavuus. Sähkölämmitteinen sauva on suunniteltu siten, että lämpötilagradientti on lähes lineaarinen sauvan pituussuunnassa. Sauvan mitattava lämpötila-alue on 283–573 K, ja mittaus tehdään sauvatyyppikohtaisella erikoislaitteella, jossa on osoitinkisko. Aineen sulamislämpötilan määritystä varten näytettä levitetään ohuelti suoraan kuuman sauvan pinnalle. Muutamassa sekunnissa muodostuu selvä raja nestemäisen ja kiinteän faasin välille. Rajan lämpötila luetaan siirtämällä osoitin rajan kohdalle.

▼B

1.4.2.2 *Sulamismikroskooppi*

Sulamismikroskoopin avulla sulamislämpötila voidaan määrittää hyvin pienestä näytemäärästä. Sulamismikroskooppcja on monia eri tyyppejä. Useimmissa malleissa lämpötila mitataan herkän termoparin avulla, mutta myös elohopeamittaria käytetään. Tyypillisessä sulamismikroskoopissa on kuumennuskammio ja tämän sisällä metallilevy, jolle näytettä sisältävä objektilasi asetetaan. Tarvittava valo saadaan kammioon mikroskoopin valaisupeilistä metallilevyn keskiön reiän kautta. Kammion sulkeva lasilevy estää ilman pääsyn näytealueelle mittauksen aikana.

Näytteen kuumentamista säätää reostaatti. Hyvin tarkoissa optisesti anisotrooppisten aineiden mittauksissa voidaan käyttää polarisoitua valoa.

1.4.2.3 *Meniskimenetelmä*

Tätä menetelmää käytetään erityisesti polyamidien ominaisuuksien mittauksissa.

Määritetään visuaalisesti lämpötila, jossa polyamidinäytteellä lepäävä kuumennusalustan ja lasilevyn välinen silikoniöljymeniski liikkuu.

1.4.3 **Jäätymislämpötilan määritysmenetelmä**

Näyte pannaan erityiseen koeputkeen, joka asetetaan jäätymislämpötilan määrityslaitteeseen. Näytettä hämmennetään kevyesti koko jäähdyttämisen ajan. Mitataan lämpötila sopivin välein. Kun lämpötila on pysynyt samana muutaman mittauksen ajan, tämä lämpötila (lämpömittarin virheellä korjattuna) katsotaan jäätymislämpötilaksi.

Alijäähtymistä on vältettävä pitämällä yllä kiinteän ja nestemäisen faasin välistä tasapainoa.

1.4.4 **Terminen analyysi**

1.4.4.1 *Differentiaaliterminen analyysi (DTA)*

Tämän tekniikan avulla voidaan rekisteröidä näytteen ja vertailuaineen lämpötilaero lämpötilan funktiona, kun näytettä ja vertailuainetta käsitellään saman valvotun lämpötilaohjelman mukaan. Kun näytteessä tapahtuu entalpiamuutoksen sisältävä olomuodon muutos, muutos näkyy endotermisenä (sulaminen) tai eksotermisenä (jäätyminen) poikkeamana lämpötilakäyrän perusviivasta.

▼B

1.4.4.2 *Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria (DSC)*

Tämän tekniikan avulla voidaan rekisteröidä näytteen ja vertailuaineen energianottoero lämpötilan funktiona, kun näytettä ja vertailuainetta käsitellään saman valvotun lämpötilaohjelman mukaan. Tämä energiaero on energiamäärä, joka tarvitaan pienentämään näytteen ja vertailuaineen lämpötilaero nollaan. Kun näytteessä tapahtuu entalpiamuutoksen sisältävä muodonmuutos, muutos näkyy endotermisenä (sulaminen) tai eksotermisena (jäätyminen) poikkeamana lämpövirran perusviivasta.

1.4.5 **Jähmettymispiste**

Tätä paloöljyjä varten kehitettyä menetelmää voidaan käyttää alhaisen sulamispisteen omaavien öljymäisten aineiden tutkimiseen.

Alustavan kuumennuksen jälkeen näytettä jäähdytetään määrätyllä nopeudella. Jäähtymisen aikana näytteen virtausominaisuuksia tarkastellaan 3 K:n välein. Alin lämpötila, jossa vielä esiinny liikettä, on aineen jähmettymispiste.

1.5 LAATUKRITEERIT

Sulamislämpötilan tai sulamisalueen määritykseen tarkoitettujen menetelmien soveltuvuus ja tarkkuus kuvataan seuraavassa taulukossa:

TAULUKKO: MENETELMIEN SOVELTUVUUS

A. **Kapillaarimenetelmät**

Mittausmenetelmä	Jauhettavat aineet	Vaikeasti jauhettavat aineet	Lämpötila-alue	Arvioitu tarkkuus [1]	Nykyinen standardi
Nestehauteella varustetut sulamislämpötilalaitteet	kyllä	vain harvat	273–573 K	± 0,3K	JIS K 0064
Metallikappaleeseen perustuvat sulamislämpötilalaitteet	kyllä	vain harvat	293... > 573 K	± 0,5K	ISO 1218(E)
Valokennoilmaisin	kyllä	useat (erikoislaitteiden avulla)	253–573 K	± 0,5 K	

[1] Vaihtelee laitteen tyypin ja aineen puhtausasteen mukaan.

▼B

B. **Kuuma-alusta- ja jäätymismenetelmät**

Mittausmenetelmä	Jauhettavat aineet	Vaikeasti jauhettavat aineet	Lämpötila-alue	Arvioitu tarkkuus (1)	Nykyinen standardi
Koflerin kuumasauva	kyllä	ei	283... > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Sulamismikroskooppi	kyllä	vain harvat	273... > 573 K	± 0,5K	DIN 53736
Meniskimenetelmä	ei	erityisesti polyamidit	293... > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Jäätymislämpötilamenetelmät	kyllä	kyllä	223–573 K	± 0,5 K	esim. BS 4695

(1) Vaihtelee laitteen tyypin ja aineen puhtausasteen mukaan.

C. **Terminen analyysi**

Mittausmenetelma	Jauhettavat aineet	Vaikeasti jauhettavat aineet	Lämpötila-alue	Arvioitu tarkkuus (1)	Nykyinen standardi
Differentiaaliterminen analyysi	kyllä	kyllä	173–1 273 K	enintään 600 K ± 0,5 K enintään 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria	kyllä	kyllä	173–1 273 K	enintään 600 K ± 0,5 K enintään 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Vaihtelee laitteen tyypin ja aineen puhtausasteen mukaan.

D. **Jähmettymispiste**

Mittausmenetelmä	Jauhettavat aineet	Vaikeasti jauhettavat aineet	Lämpötila-alue	Arvioitu tarkkuus (1)	Nykyinen standardi
Jähmettymispiste	paloöljyt ja öljymäiset aineet	paloöljyt ja öljymäiset aineet	223–323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Vaihtelee laitteen tyypin ja aineen puhtausasteen mukaan.

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

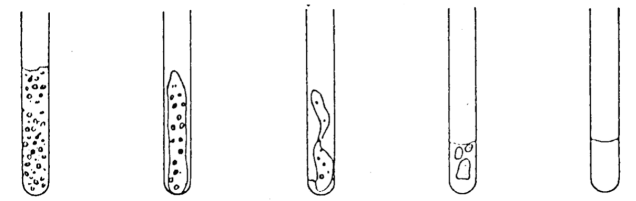
Testimenetelmien työjärjestys on pääosin kuvattu kansainvälisissä ja kansallisissa standardeissa (katso liitettä 1)

1.6.1 **Kapillaariputkimenetelmät**

Kun hienoksi jauhettua ainetta kuumennetaan hitaasti, siinä on yleensä havaittavissa kuvassa 1 esitettävät sulamisvaiheet.

▼B

Kuva 1



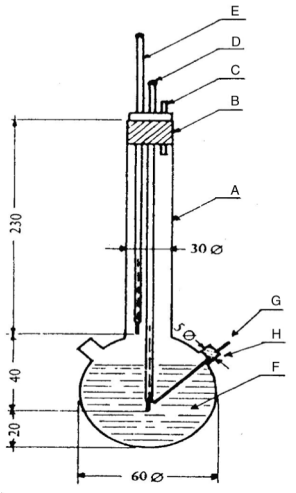
Vaihe A	Sulaminen alkaa: Kapillaariputken sisäseinälle muodostuu yhtenäinen kerros pieniä pisaroita.
Vaihe B	Kutistuminen: Näytteen ja putken sisäseinän väliin muodostuu tyhjä tila.
Vaihe C	Kutistunut näyte vajoaa kasaan ja muuttuu nestemäiseksi.
Vaihe D	Yhtenäinen meniski muodostuu koeputken sisällön pinnalle, mutta huomattava osa näytettä on vielä kiinteässä muodossa.
Vaihe E	Sulamisen loppuvaihe: Nesteen seassa ei enää ole kiinteitä hiukkasia.

Sulamislämpötila määritetään rekisteröimällä sulamisen alku- ja lopulämpötila.

1.6.1.1 *Nestehauteella varustetut sulamislämpötilalaitteet*

Kuvassa 2 on lasista valmistettu standardoitu sulamislämpötilalaite (JIS K 0064). Kaikki mitat ovat millimetreinä.

Kuva 2



A: Mitta-astia
B: Tulppa
C: Ilmaputki
D: Lämpömittari
E: Apulämpömittari
F: Haudeneste
G: Lasinen kapillaariputki, pituus 80–100 mm, sisähalkaisija 1,0 ± 0,2 mm, lasiseinän paksuus 0,2–0,3 mm
H: Sivuputki

▼B

Haudeneste:

Haudeneste valitaan määritettävän sulamislämpötilan mukaan. Jos esimerkiksi sulamislämpötila on enintään 473 K, käytetään paloöljyä, ja jos sulamislämpötila on enintään 573 K, käytetään silikoniöljyä.

Jos sulamislämpötila on suurempi kuin 523 K, voidaan käyttää seosta, jossa on kolme paino-osaa rikkihappoa ja kaksi paino-osaa kaliumsulfaattia. Tätä seosta käytettäessä on noudatettava tarpeellisia varotoimenpiteitä.

Lämpömittari

Käytettävän lämpömittarin tulee täyttää seuraavat tai niitä vastaavat standardit:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Työjärjestys:

Kuiva näyte hienonnetaan huhmareessa ja siirretään kapillaariputkeen, jonka toinen pää on suljettu. Näytettä pannaan putkeen sellainen määrä, että sen korkeus tiiviiksi pakattuna on noin 3 mm. Yhtenäisen pakkaustiiviyden saavuttamiseksi kapillaariputki pudotetaan noin 700 mm:n korkeudelta kohtisuoraan lasiputken läpi kellonlasille.

Täytetty kapillaariputki asetetaan hauteeseen siten, että lämpömittarin elohopeanuppi koskettaa kapillaariputkea näytteen kohdalta. Kun kapillaariputki asetetaan hauteeseen, sen lämpötila on yleensä noin 10 K alle sulamislämpötilan.

Hauteen nestettä kuumennetaan siten, että lämpötilan nousu on noin 3 K/min. Nestettä on hämmennettävä. Kun lämpötila on noin 10 K alle sulamislämpötilan, kuumenemista säädetään, niin että lämpötilan nousu on enintään 1 K/min.

Tuloksen laskenta:

Sulamislämpötila lasketaan seuraavan suureyhtälön mukaan:

$$T = T_D + 0{,}00016\ (T_D - T_E)n$$

jossa:

T = korjattu sulamislämpötila kelvineinä

T_D = D-lämpömittarin lukema kelvineinä

T_E = E-lämpömittarin lukema kelvineinä

n = D-lämpömittarin nesteen yläpuolella olevan varren elohopeapylvään astejakojen määrä

1.6.1.2 *Metallikappaleeseen perustuvat sulamislämpötilalaitteet*

Laitteisto:

Laitteiston osat ovat seuraavat:

— sylinterinmuotoinen metallikappale, jonka yläosa on ontto ja muodostaa kammion (katso kuvaa 3),

— metallitulppa, jossa on vähintään kaksi reikää, joiden kautta metallikappaleeseen voidaan työntää putkia,

▼B

— metallikappaleen kuumennusjärjestelmä, esimerkiksi kappaleen sisällä oleva sähkövastus,

— reostaatti tehonsäätöä varten (jos käytössä on sähkölämmitys),

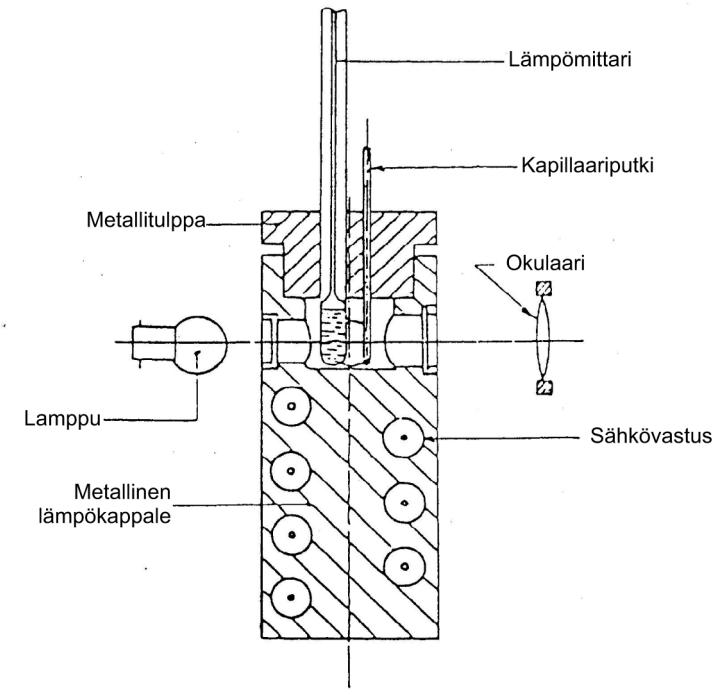
— kammion sivuseinissä neljä lämmönkestävää lasi-ikkunaa, jotka ovat vastakkain ja toisiinsa nähden suorassa kulmassa; yhden ikkunan edessä on okulaari kapillaariputken tarkastelua varten, muiden ikkunoiden läpi johdetaan lampuista valoa kammion sisäosaan,

— lämmönkestävästä lasista valmistettu kapillaariputki, jonka toinen pää on suljettu (katso kohtaa 1.6.1.1).

Lämpömittari:

Katso kohdassa 1.6.1.1 mainittavia standardeja. Myös riittävän tarkkoja lämpösähköisiä mittauslaitteita voidaan käyttää.

Kuva 3



1.6.1.3 *Valokennoilmaisin*

Laitteisto ja työjärjestys:

Laitteisto on automaattisella kuumennusjärjestelmällä varustettu metallikammio. Kolme kapillaariputkea täytetään kohdan 1.6.1.1 ohjeiden mukaan ja asetetaan uuniin.

▼B

Laitteiston kalibroinnin avulla saadaan useita lineaarisia lämpötilan nousukäyriä. Kuumennus säädetään sähköisesti valitun vakion ja lineaarisen nousukäyrän mukaan. Uunin lämpötila ja kapillaariputkessa olevien näytteiden lämpötila ilmenevät rekisteröintilaitteesta.

1.6.2 **Kuuma-alustat**

1.6.2.1 *Koflerin kuumasauva*

Katso liitettä.

1.6.2.2 *Sulamismikroskooppi*

Katso liitettä.

1.6.2.3 *Meniskimenetelmä (polyamidit)*

Katso liitettä.

Sulamislämpötilan alueella lämpötilan nousun on oltava alle 1 K/min.

1.6.3 **Jäätymislämpötilan määritysmenetelmät**

Katso liitettä.

1.6.4 **Terminen analyysi**

1.6.4.1 *Differentiaaliterminen analyysi*

Katso liitettä.

1.6.4.2 *Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria*

Katso liitettä.

1.6.5 **Jähmettymispisteen määritys**

Katso liitettä.

2. **TIEDOT**

Joissakin tapauksissa lämpömittarin korjaus on tarpeen.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä,

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset,

— arvio tarkkuudesta.

Sulamislämpötilana raportoidaan vähintään kahden arvioidulla tarkkuusalueella (katso taulukoita) olevan mittauksen keskiarvo.

▼B

Jos sulamisen alku- ja loppulämpötilan ero on menetelmän tarkkuusrajojen sisällä, sulamislämpötilana raportoidaan sulamisen loppuvaiheen lämpötila. Muussa tapauksessa molemmat lämpötilat raportoidaan.

Jos aine hajoaa tai höyrystyy ennen sulamislämpötilaa, raportoidaan lämpötila, jossa hajoaminen tai höyrystyminen on tapahtunut.

Raporttiin tulee sisällyttää myös kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

4. **VIITTEET**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) UIPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II, 803-834.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

(4) UICPA, Physiochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505–515.

▼B

Liite

Lisää teknisiä tietoja on seuraavissa standardeissa.

1. **Kapillaarimenetelmät**

1.1 Nestehauteella varustetut sulamislämpötilalaitteet

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products.

1.2 Metallikappaleeseen perustuvat sulamislämpötilalaitteet

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of 'melting point'

2. **Kuuma-alustat**

2.1 Koflerin kuumasauva

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings

2.2 Sulamismikroskooppi

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3 Meniskimenetelmä (polyamidit)

ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of 'melting point'

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du 'point de fusion'. méthode du ménisque.

3. **Jäätymislämpötilan määritysmenetelmät**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallsation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Terminen analyysi**

4.1 Terminen differentiaalianalyysi

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2 Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Jähmettymispisteen määritys**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: point de trouble et point d'ecoulement limite — Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils — Determination of pour point.

▼B

A.2 KIEHUMISLÄMPÖTILA

1. MENETELMÄ

Tässä kuvattavat menetelmät perustuvat pääosin OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteissä (2) ja (3).

1.1 JOHDANTO

Tässä kuvattuja menetelmiä ja laitteita voidaan soveltaa nesteiden ja matalissa lämpötiloissa sulavien aineiden kiehumispisteen määritykseen, edellyttäen että aineissa ei tapahdu kemiallisia reaktioita ennen kiehumista (esimerkiksi itsehapettumista, rakennemuutoksia, hajoamista tms.). Menetelmät soveltuvat sekä puhtaisiin että epäpuhtaisiin nestemäisiin aineisiin.

Päähuomion kohteena ovat valokennoilmaisimiin ja termiseen analyysiin perustuvat menetelmät, koska näiden menetelmien avulla voidaan määrittää sekä sulamis- että kiehumislämpötila. Lisäksi mittaukset voidaan suorittaa automaattisesti.

Ns. dynaamisen menetelmän etu on se, että menetelmää voidaan käyttää höyrynpaineen määritykseen. Tällöin kiehumislämpötilaa ei tarvitse korjata normaaliin paineeseen (101,325 kPa), koska normaalipainetta voidaan mittauksen aikana säätää painekytkimen avulla.

Huomautuksia:

Epäpuhtauksien vaikutus kiehumislämpötilan määritykseen vaihtelee huomattavasti niiden luonteen mukaan. Jos näyte sisältää haihtuvia epäpuhtauksia, jotka voivat vaikuttaa tulokseen, aine voidaan puhdistaa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan normaali kiehumislämpötila on lämpötila, jossa nesteen höyrynpaine on 101,325 kPa.

Jos kiehumislämpötilaa ei mitata normaalissa ilmakehän paineessa, lämpötilan riippuvuus höyrynpaineesta voidaan esittää Clausius-Clapeyronin yhtälön avulla:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2,3\ RT} + const.$$

jossa:

p = aineen höyrynpaine (Pa)

ΔH_v = höyrystymislämpö (J mol^{-1})

R = yleinen molaarinen kaasuvakio (8,314 J mol^{-1} K^{-1})

T = termodynaaminen lämpötila (K)

Kiehumislämpötilan rekisteröinnissä otetaan huomioon mittauksen aikana vallitseva ympäristön paine.

▼B

Muunnokset:

Paine (yksikkö: kPa)

100 kPa = 0,1 bar = 0,1 MPa

(yksikköä bar (baari) saa edelleen käyttää, mutta sitä ei suositella)

133 Pa = 1 mmHg = 1 Torr

(yksiköitä mmHg ja Torr ei saa käyttää)

1 atm = normaali-ilmakehä = 101 325 Pa

(yksikköä atm ei saa käyttää)

Lämpötila (yksikkö: K)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius-lämpötila, Celsius-asteina (^{o}C)

T: termodynaaminen lämpötila, kelvineinä (K)

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

Liitteessä kuvattavissa menetelmissä mainitaan joitakin kalibrointiaineita.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATTEET

Kiehumislämpötilan (kiehumisalueen) määritysmenetelmistä viisi perustuu kiehumislämpötilan mittaamiseen ja kaksi termiseen analyysiin.

1.4.1 **Ebulliometrimenetelmä**

Ebulliometrit kehitettiin alun perin molekyylipainon määritykseen kiehumispisteen kohoamisen avulla, mutta niitä voidaan myös käyttää tarkan kiehumislämpötilan määritykseen. Standardissa ASTM D 1120-72 (katso liitettä) kuvataan yksinkertainen laitteisto, jolla neste kuumennetaan tasapaino-olosuhteissa kiehumispisteeseen.

1.4.2 **Dynaaminen menetelmä**

Mitataan höyryn jälleenlauhtumislämpötila pitämällä tarkoitukseen soveltuvaa lämpömittaria höyryn palautusvirrassa nesteen kiehuessa. Tämä menetelmä sallii paineen vaihtelun.

1.4.3 **Tislausmenetelmä**

Neste tislataan ja höyryn jälleenlauhtumislämpötila sekä tisleen määrä mitataan.

▼B

1.4.4 **Siwoloboffin menetelmä**

Näyte kuumennetaan putkiottimessa, joka upotetaan kuumahauteen nesteeseen. Putkiottimeen pannaan suljettu kapillaari, jonka alaosassa on ilmakupla.

1.4.5 **Valokennomenetelmä**

Tehdään automaattisia valosähköisiä mittauksia nousevien ilmakuplien avulla Siwoloboffin menetelmän mukaan.

1.4.6 **Differentiaaliterminen analyysi**

Tämän tekniikan avulla voidaan rekisteröidä näytteen ja vertailuaineen lämpötilaero lämpötilan funktiona, kun näytettä ja vertailuainetta käsitellään saman valvotun lämpötilaohjelman mukaan. Kun näytteessä tapahtuu entalpiamuutoksen sisältävä olomuodon muutos, muutos näkyy endotermisenä (kiehuminen) poikkeamana lämpötilakäyrän perusviivasta.

1.4.7 **Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria**

Tämän tekniikan avulla voidaan rekisteröidä näytteen ja vertailuaineen energianottoero lämpötilan funktiona, kun näytettä ja vertailuainetta käsitellään saman valvotun lämpötilaohjelman mukaan. Tämä energiaero on energiamäärä, joka tarvitaan pienentämään näytteen ja vertailuaineen lämpötilaero nollaan. Kun näytteessä tapahtuu entalpiamuutoksen sisältävä olomuodon muutos, muutos näkyy endotermisenä (sulaminen) poikkeamana lämpövirran perusviivasta.

1.5 LAATUKRITEERIT

Kiehumislämpötilan ja kiehumisalueen määritykseen tarkoitettujen menetelmien soveltuvuus ja tarkkuus kuvataan taulukossa 1.

Taulukko 1

Menetelmien vertailu

Mittausmenetelmä	Arvioitu tarkkuus	Nykyinen standardi
Ebullioometri	± 1,4 K (enintään 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (enintään 600 K) (1) (2)	ASTMD 1120-720 (1)
Dynaaminen menetelmä	± 0,5 K (enintään 600 K) (2)	
Tislausprosessi (kiehumisalue)	± 0,5 K (enintään 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboffin menetelmä	± 2 K (enintään 600 K) (2)	
Valokennomenetelmä	± 0,3 K (enintään 373 K) (2)	
Differentiaaliterminen analyysi	± 0,5 K (enintään 600 K) ± 2,0 K (enintään 1 273 K)	ASTM E 537-76
Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria	± 0,5 K (enintään 600 K) ± 2,0 K (enintään 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Koskee vain esimerkiksi ASTM D 1120-72:ssa kuvattujen yksinkertaisten laitteiden avulla tehtäviä määrityksiä. Tarkkuutta voidaan parantaa käyttämällä kehittyneempiä laitteita.
(2) Koskee vain puhtaita aineita. Menetelmän käyttö muissa olosuhteissa on perusteltava.

▼B

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

Joidenkin testimenetelmien työjärjestys on kuvattu kansainvälisissä ja kansallisissa standardeissa (katso liitettä).

1.6.1 **Ebulliometrimenetelmä**

Katso liitettä.

1.6.2 **Dynaaminen menetelmä**

Katso testimenetelmää A4, höyrynpaineen määritys.

Rekisteröidään havaittu kiehumislämpötila 101,325 kPa:n paineessa.

1.6.3 **Tislausmenetelmä**

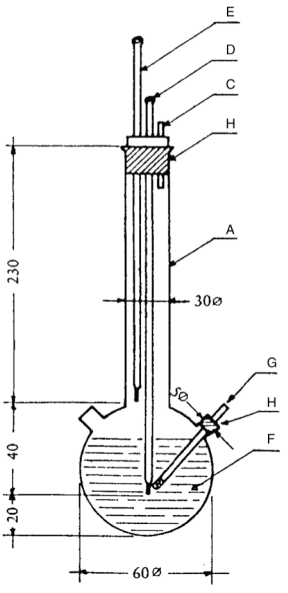
Katso liitettä.

1.6.4 **Siwoloboffin menetelmä**

Näyte pannaan putkiottimeen, jonka halkaisija on noin 5 mm (kuva 1). Putkiotinta kuumennetaan sulamislaitteella.

Kuvassa 1 on lasista valmistettu standardisoitu sulamis- ja kiehumislämpötilalaite (JIS K 0064). Kaikki mitat ovat millimetreinä.

Kuva 1



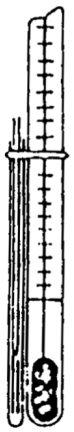
A: Mitta-astia
B: Korkki
C: Ilmanvaihtoputki
D: Lämpömittari
E: Apulämpömittari
F: Haudeneste
G: Putkiotin, jonka ulkohalkaisija on enintään 5 mm, ja sen sisällä kapillaariputki, jonka pituus on noin 100 mm, sisähalkaisija noin 1 mm ja lasiseinän paksuus 0,2-0,3 mm
H: Sivuputki

Kapillaariputki (kiehumiskapillaari), joka on suljettu noin 1 cm alareunan yläpuolelta, asetetaan putkiottimeen. Näytettä lisätään niin paljon, että kapillaariputken suljettu osa on nestepinnan alapuolella. Kiehumiskapillaarin sisältävä putkiotin kiinnitetään lämpömittariin kuminauhan avulla tai tuetaan sivulta muulla tavoin (katso kuva 2).

▼B

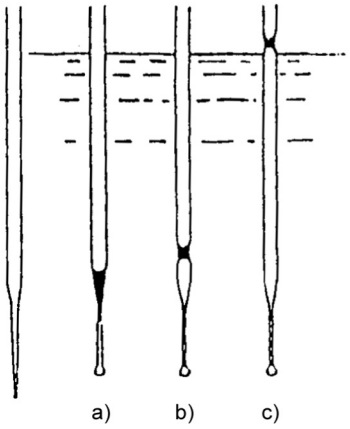
Kuva 2

Siwoloboffin periaate



Kuva 3

Muunneltu periaate



Haudeneste valitaan mitattavan kiehumislämpötilan mukaan. Mitattaessa alle 573 K:n lämpötiloja voidaan käyttää silikoniöljyä. Parafiiniöljyä voidaan käyttää vain 473 K:iin asti. Alussa haudenestettä kuumennetaan siten, että lämpötila nousee 3 K/min. Kuumentamisen aikana nestettä on hämmennettävä. Kun lämpötila on noin 10 K odotetun kiehumispisteen alapuolella, kuumennusta hidastetaan, niin että lämpötila nousee alle 1 K/min. Kun lämpötila on saavuttanut kiehumispisteen, kiehumiskapillaarista alkaa nopeasti nousta kuplia.

Kiehumislämpötila on lämpötila, jossa kuplien nousu lakkaa ja neste alkaa nousta nopeasti kapillaariputkessa hetkellisen jäähdyttämisen seurauksena. Lämpömittarin lukema osoittaa tällöin näytteen kiehumislämpötilaa.

Muunnetun periaatteen mukaan (kuva 3) kiehumispiste määritetään sulamislämpötilakapillaarin avulla. Kapillaariputkeen imetään näytettä, kunnes näytepatsaan korkeus kapillaarissa on noin 2 cm (a). Kapillaariputken kapea pää suljetaan sulattamalla ja pieni ilmakupla jätetään ääripäähän. Kun putkea kuumennetaan sulamislämpötilalaitteessa (b), ilmakupla laajenee. Kiehumislämpötila on se lämpötila, jossa näytteen muodostama tulppa saavuttaa haudenesteen pinnan (c).

1.6.5 **Valokennomenetelmä**

Tässä menetelmässä kuumennettava näyte on metallikappaleeseen asetetussa kapillaariputkessa.

Metallikappaleen reikien kautta johdetaan valonsäde näytteen läpi tarkasti kalibroituun valokennoon.

Kun näytteen lämpötila nousee, kiehumiskapillaarista nousee yksittäisiä kuplia. Kun kiehumislämpötila saavutetaan, kuplien määrä lisääntyy huomattavasti. Tämä aiheuttaa muutoksen valokennon rekisteröimässä valon intensiteetissä. Valokennosta lähtee pysäytyssignaali osoitinlaitteeseen, joka lukee metallikappaleessa sijaitsevan platinavastuslämpömittarin lukeman.

Tämä menetelmä on erityisen käytännöllinen, koska sillä voidaan tehdä määrityksiä kylmissä lämpötiloissa — jopa 253,15 K:ssa (–20 °C:ssa) asti — ilman laitteeseen tehtäviä muutoksia. Riittää, kun laite asetetaan jäähdytyshauteeseen.

▼B

1.6.6 **Terminen analyysi**

1.6.6.1 *Differentiaaliterminen analyysi*

Katso liitettä.

1.6.6.2 *Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria*

Katso liitettä.

2. **TIEDOT**

Kun poikkeamat normaalipaineesta ovat pieniä (enintään ± 5 kPa), kiehumislämpötilat normalisoidaan T_n:ään Sidney Youngin yhtälön avulla:

$T_n = T + (f_T x \Delta p)$

jossa:

Δp = (101,325 - p) [huomaa etumerkki]

p = paine (kPa)

f_T = kiehumislämpötilan muutos paineen funktiona (K/kPa)

T = mitattu kiehumislämpötila (K)

T_n = normaalipaineeseen korjattu kiehumislämpötila (K).

Lämpötilan korjausvakiot (f_T) ja yhtälöt näiden vakioiden likiarvojen laskemista varten sisältyvät monien aineiden kohdalla edellä mainittuihin kansainvälisiin ja kansallisiin standardeihin.

Esimerkiksi DIN 53171 -menetelmä mainitsee seuraavat karkeat korjaukset maaleissa käytettävien liuottimien osalta:

Taulukko 2

Lämpötilat ja vastaavat korjauskertoimet f_T

Lämpötila T (K)	Korjauskerroin f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä,

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset,

— arvio tarkkuudesta.

Kiehumislämpötilana raportoidaan vähintään kahden, arvioidun tarkkuusalueen (katso taulukoita) sisällä olevan mittauksen keskiarvo.

Ilmoitetaan mitatut kiehumislämpötilat ja näiden keskiarvo. Mittaushetkellä vallinnut paine ilmoitetaan kilopascaleina (kPa). Paineen tulisi olla lähellä normaalia ilmakehän painetta.

Raporttiin tulee sisällyttää myös kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

4. **VIITTEET**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) UICPA, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Liite

Lisää teknisiä tietoja on seuraavissa standardeissa.

1. **Ebulliometri**

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Tislausprosessi (kiehumisalue)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Differentiaaliterminen analyysi ja differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria**

ASTM F 537 76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definition of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe

▼B

A.3 SUHTEELLINEN TIHEYS

1. MENETELMÄ

Tässä kuvattavat menetelmät perustuvat pääosin OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteessä (2).

1.1 JOHDANTO

Tässä kuvattavia suhteellisen tiheyden määritysmenetelmiä voidaan soveltaa kiinteisiin ja nestemäisiin aineisiin, ilman rajoituksia aineiden puhtauden suhteen. Luettelo menetelmistä on taulukossa 1.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Kiinteiden ja nestemäisten aineiden suhteellinen tiheys (D_4^{20}) ilmaisee tutkittavan aineen (t = 20 °C) tilavuuden massan ja saman vesimäärän (t = 4 °C) massan suhteen. Suhteellisella tiheydellä ei ole yksikköä.

Aineen tiheys ρ on sen massan (m) ja tilavuuden (v) suhde.

Tiheys ρ ilmaistaan SI-yksikköinä kg/m^3.

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 TESTIMENETELMIEN PERIAATTEET

Käytössä on neljä menetelmäluokkaa.

1.4.1 **Nesteeseen perustuvat menetelmät**

1.4.1.1 *Hydrometri* (nestemäiset aineet)

Nesteen tiheys voidaan määrittää nopeasti ja tyydyttävän tarkasti kelluvan hydrometrin avulla, jonka asteikosta voidaan lukea uppoamissyvyyteen perustuva tiheyslukema.

1.4.1.2 *Hydrostaattinen vaaka* (nestemäiset ja kiinteät aineet)

Aineen tiheys voidaan määrittää punnitsemalla näyte ensin ilmassa ja sen jälkeen sopivassa nesteessä (esimerkiksi vedessä).

Kiinteiden aineiden kohdalla mitattu tiheys on edustava vain kyseisen näytteen osalta. Nesteiden tiheys määritetään siten, että tunnettu tilavuus (v) punnitaan ensin ilmassa ja sen jälkeen nesteessä.

1.4.1.3 *Uppokappalemenetelmä* (nestemäiset aineet) (4)

Tässä menetelmässä nesteen tiheys määritetään kahden punnitustuloksen eron perusteella. Kun näyte on ensin punnittu, siihen upotetaan kappale, jonka tilavuus on tunnettu, ja punnitus toistetaan.

▼B

1.4.2 **Pyknometrimenetelmät**

Erimuotoisia pyknometrejä, joiden tilavuus on tunnettu, voidaan käyttää kiinteiden ja nestemäisten aineiden tiheyksien määritykseen. Tiheys lasketaan täyden ja tyhjän pyknometrin painoeron ja sen tunnetun tilavuuden perusteella.

1.4.3 **Kaasuvertailupyknometri** (kiinteät aineet)

Kaasuvertailupyknometrin avulla voidaan mitata minkä tahansa aineen tiheys huoneenlämpötilassa, olipa aineen muoto mikä tahansa. Aineen tilavuus mitataan ilmassa tai inerttikaasussa sylinterissä, jonka tilavuus on muutettavissa ja kalibroitu. Tiheyden laskemista varten mitataan tilavuusmittauksen jälkeen aineen massa.

1.4.4 **Oskilloiva densitometri** (5) (6) (7)

Tämän laitteen avulla voidaan mitata nesteen tiheys. U-putken muotoinen mekaaninen oskillaattori asetetaan värähtelemään oskillaattorin resonanssitaajuudella, joka määräytyy oskillaattorin massan mukaan. Kun oskillaattoriin pannaan näyte, resonanssitaajuus muuttuu. Laitteen kalibroinnissa käytetään kahta nestemäistä ainetta, joiden tiheys tunnetaan. Kalibrointiaineet valitaan siten, että niiden tiheydet kattavat mitattavan alueen.

1.5 LAATUKRITEERIT

Jäljempänä olevassa taulukossa esitetään suhteellisen tiheyden määritysmenetelmien soveltuvuus eri tarkoituksiin.

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

Lisätietoja teknisistä yksityiskohdista on mm. liitteessä mainituissa standardeissa.

Testit tulee suorittaa lämpötilassa 20 °C. Vähintään kaksi mittausta vaaditaan.

2. **TIEDOT**

Katso standardeja.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä,

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset.

Suhteellinen tiheys (D_4^{20}) raportoidaan kohdan 1.2 määrityksen mukaan. Lisäksi on mainittava mitattavan aineen fysikaalinen olomuoto.

Raporttiin tulee sisällyttää myös kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

▼B

Taulukko

menetelmien soveltuvuus

Mittausmenetelmä	Tiheys		Suurin mahdollinen dynaaminen viskositeetti	Nykyiset standardit
	kiinteä aine	neste		
1.4.1.1 Hydrometri		kyllä	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2 Hydrostaattinen vaaka				
(a) kiinteät aineet	kyllä			ISO 1183 (A)
(b) nesteet		kyllä	5 Pa s	ISO 901 ja 758
1.4.1.3 Uppokappalemenetelmä		kyllä	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2 Pyknometri				ISO 3507
(a) kiinteät aineet	kyllä			ISO 1183 (B), NF T 20-053
(b) nesteet		kyllä	500 Pa s	ISO 758
1.4.3 Kaasuvertailupyknometri	kyllä			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4 Oskilloiva densitometri		kyllä	5 Pa s	

4. **VIITTEET**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realisation of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Fliissigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. 11, 427–430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297–302.

(6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichteb estimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung — Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717–726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253–255.

▼B

Liite

Lisää teknisiä tietoja on seuraavissa standardeissa:

1. **Nesteeseen perustuvat menetelmät**

1.1 Hydrometri

DIN 12790, IS0 387	Hydrormeter; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use — Determination of density of liquids — Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2 Hydrostaattinen vaaka

Kiinteät aineet

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use — Determination of density and relative density of solids other than powders and cellular products — Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Nestemäiset aineet

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 ja ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3 Uppokappalemenetelmät

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method

2. **Pyknometriset menetelmät**

2.1 Nestemäiset aineet

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100×10^{-6} m^2 s^{-1} at 15 °C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100×10^{-6} m^2 s^{-1} at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼B

DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have a too high vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol-water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side rube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products — chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary — stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pycnometric method

▼B

2.2	Kiinteät aineet	
	ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
	NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pycnometric method
	DIN 19683	Determination of the density of soils
3.	**Kaasuvertailupyknometri**	
	DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. HÖYRYNPAINE

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 104 (2004).

1.1 JOHDANTO

Tämä testimenetelmän A.4 (1) tarkistettu versio sisältää yhden uuden menetelmän. Kyseessä on effuusiomenetelmä: isoterminen termogravimetria, joka on kehitetty sellaisia aineita varten, joiden höyrynpaine on hyvin alhainen (arvoon 10^{-10} saakka). Koska uusia menetelmiä tarvitaan erityisesti sellaisten aineiden höyrynpaineen määrittämiseksi, joiden höyrynpaine on alhainen, muita tähän testimenetelmän kuuluvia menetelmiä arvioidaan uudelleen sen perusteella, voidaanko niitä käyttää muillakin määritysalueilla.

Termodynaamisen tasapainon vallitessa puhtaan aineen höyrynpaine vaihtelee ainoastaan lämpötilan funktiona. Perusperiaatteita käsitellään kirjallisuuslähteissä (2)(3).

Mitään yksittäistä mittausmenetelmää ei voida käyttää koko höyrynpainealueella arvoa 10^{-10} pienemmistä arvoista arvoon 10^5 Pa. Tähän testimenetelmään kuuluu kahdeksan höyrynpaineen mittausmenetelmää, joita voidaan käyttää eri höyrynpainealueilla. Eri menetelmiä verrataan niiden soveltuvuuden ja mittausalueen suhteen taulukossa 1. Menetelmiä voidaan käyttää ainoastaan sellaisten yhdisteiden tutkimiseen, jotka eivät hajoa testiolosuhteissa. Jos kokeellisia menetelmiä ei voida käyttää teknisistä syistä, höyrynpaine voidaan myös arvioida. Sopivaa arviointimenetelmää kuvataan tämän testimenetelmän lisäyksessä.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan aineen höyrynpaine on kiinteään tai nestemäiseen aineeseen ylhäältä kohdistuva kyllästyspaine.

Paineen SI-yksikkö on pascal (Pa), jota tulee käyttää tässä yhteydessä. Aiemmin käytetyt yksiköt ja niiden muuntokertoimet ovat seuraavat:

1 Torr	= 1 mm Hg	= $1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 ilmakehä	= $1{,}013 \times 10^5$ Pa	
1 baari (bar)	= 10^5 Pa	

Lämpötilan SI-yksikkö on kelvin (K). Celsius-asteet muunnetaan kelvineiksi seuraavan kaavan avulla:

$$T = t + 273{,}15$$

jossa T on kelvineinä ilmaistu termodynaaminen lämpötila ja t on lämpötila Celsius-asteina.

▼**M1**

Taulukko 1

Mittausmenetelmä	Aineet		Arvioitu toistettavuus	Arvioitu uusittavuus	Suositeltu alue
	Kiinteät	Nestemäiset			
Dynaaminen menetelmä	Alhainen sulamispiste	Kyllä	Enintään 25 % 1–5 %	Enintään 25 % 1–5 %	10^3 Pa – 2 × 10^3 Pa 2 × 10^3 Pa – 10^5 Pa
Staattinen menetelmä	Kyllä	Kyllä	5–10 %	5–10 %	10 Pa – 10^5 Pa 10^{-2} Pa – 10^5 Pa ([1])
Isoteniskooppimenetelmä	Kyllä	Kyllä	5–10 %	5–10 %	10^2 Pa – 10^5 Pa
Effuusiomenetelmä: höyrynpainevaaka	Kyllä	Kyllä	5–20 %	Enintään 50 %	10^{-3} – 1 Pa
Effuusiomenetelmä: Knudsen-kenno	Kyllä	Kyllä	10–30 %	—	10^{-10} – 1 P
Effuusiomenetelmä: isoterminen termogravimetria	Kyllä	Kyllä	5–30 %	Enintään 50 %	10^{-10} – 1 Pa
Kaasunkyllästysmenetelmä	Kyllä	Kyllä	10–30 %	Enintään 50 %	10^{-10} – 10^3 Pa
Pyörivä roottori -menetelmä	Kyllä	Kyllä	10–20 %	—	10^{-4} –0,5 Pa

([1]) Käytettäessä kapasitanssimanometriä.

1.3 TESTIN PERIAATE

Höyrynpaine määritetään yleensä eri lämpötiloissa. Rajoitetulla lämpötila-alueella puhtaan aineen höyrynpaineen logaritmi on Clausiuksen ja Clapeyronin yksinkertaistetun yhtälön mukaan suoraan verrannollinen lämpötilan käänteisarvoon:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2,3RT} + vakio$$

jossa

p = höyrynpaine (Pa)

ΔHv = höyrystymislämpö (J mol^{-1})

R = yleinen kaasuvakio (8,314 J mol^{-1} K^{-1})

T = lämpötila (K).

▼**M1**

1.4 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei tarvitse käyttää. Niitä käytetään lähinnä silloin, kun menetelmän toimivuutta tarkistetaan ajoittain tai kun eri menetelmillä saatuja tuloksia verrataan toisiinsa.

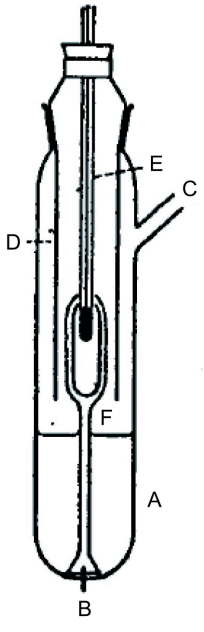
1.5 MENETELMIEN KUVAUS

1.5.1 **Dynaaminen menetelmä (Cottrellin menetelmä)**

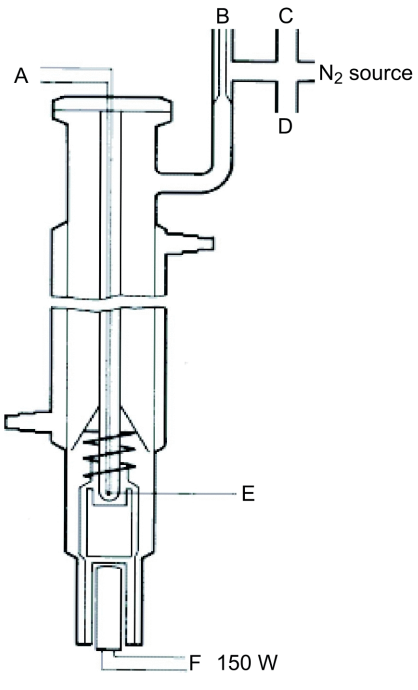
1.5.1.1 *Periaate*

Höyrynpaine määritetään mittaamalla aineen kiehumispiste useissa ennalta määrätyissä paineissa suunnilleen alueella 10^3–10^5 Pa. Menetelmää suositellaan myös kiehumispisteen määritykseen, jossa sitä voidaan käyttää lämpötilaan 600 K saakka. Nesteiden kiehumispisteet ovat noin 0,1 °C suurempia 3–4 cm:n syvyydellä kuin pinnassa, mikä johtuu nestepatsaan hydrostaattisesta paineesta. Cottrellin menetelmässä (4) lämpömittari viedään nestepinnan yläpuolella olevaan höyryyn ja kiehuvaa nestettä pumpataan jatkuvasti lämpömittarin nupin yli. Nuppia peittää ohut nestekerros, joka on tasapainossa höyryn kanssa ilmakehän paineessa. Lämpömittari osoittaa siis todellisen kiehumispisteen ilman ylikuumennuksesta tai hydrostaattisesta paineesta johtuvia virheitä. Kuva 1 esittää Cottrellin alun perin käyttämää pumppua. Kiehuva neste on putkessa A. Putken pohjaan kiinnitetty platinalanka B tasoittaa kiehumista. Sivuputki C johtaa lauhduttimeen, ja vaippa D estää kylmää lauhdetta pääsemästä lämpömittarille E. Kun putkessa A oleva neste kiehuu, suppiloon jääneet kuplat ja neste huuhtovat pumpun F molempien haarojen kautta lämpömittarin nuppia.

Kuva 1



Kuva 2



▼**M1**

Cottrellin pumppu (4)

A: Termopari

B: Tyhjiön puskuritilavuus

C: Painemittari

D: Tyhjiö

E: Mittauspiste

F: Lämmitysvastus, noin 150 W

1.5.1.2 *Laite*

Kuva 2 esittää hyvin tarkkaa, Cottrellin periaatteen mukaista laitetta. Laitteessa on putki, jonka alaosassa on kiehuntaosa, keskiosassa jäähdytin ja yläosassa ulostulo ja laippa. Cottrellin pumppu sijoitetaan kiehuntaosaan, jota kuumennetaan sähköpatruunalla. Lämpötila mitataan vaipallisella termoparilla tai vastuslämpömittarilla, joka viedään laitteen yläosassa olevan laipan kautta sisään. Ulostulo kytketään paineensäätöjärjestelmään, jossa on tyhjiöpumppu, puskuritilavuus, paineensäädin paineensäätöön tarvittavan typen johtamiseksi laitteeseen ja manometri.

1.5.1.3 *Menettely*

Näyte pannaan putken kiehuntaosaan. Jos näyte ei ole jauheena, mahdolliset ongelmat voidaan yrittää ratkaista kuumentamalla jäähdytysvaippaa. Laite suljetaan laipan kohdalta, ja näytteelle tehdään kaasunpoisto. Menetelmä ei sovellu vaahtoavien aineiden mittaukseen.

Tämän jälkeen asetetaan alin haluttu paine ja aloitetaan kuumennus. Lämpöanturi kytketään samalla rekisteröintilaitteeseen.

Järjestelmässä vallitsee tasapaino, kun vakiopaineessa mitattu kiehumislämpötila pysyy vakiona. Kiehumisen aikana on erityisesti vältettävä näytteen ”poukkoilua”. Lisäksi jäähdyttimellä on tapahduttava täydellinen tiivistyminen. Jos höyrynpaineen määritys tehdään kiinteälle aineelle, jonka sulamispiste on alhainen, on varottava lauhduttimen tukkeutumista.

Tasapainopisteen kirjaamisen jälkeen asetetaan uusi, suurempi paine. Mittauksia jatketaan 10^5 Pa:n paineeseen asti (yhteensä 5–10 mittausta). Tulokset tarkistetaan toistamalla mittaukset laskevassa painejärjestyksessä.

1.5.2 **Staattinen menetelmä**

1.5.2.1 *Periaate*

Staattisessa menetelmässä (5) mitataan tiettyä lämpötilaa vastaava höyrynpaine termodynaamisen tasapainon vallitessa. Menetelmä soveltuu kiinteiden ja nestemäisten yksi- tai monikomponenttiaineiden tutkimiseen alueella 10–10^5 Pa ja huolellisuutta noudattaen myös alueella 1–10 Pa.

▼**M1**

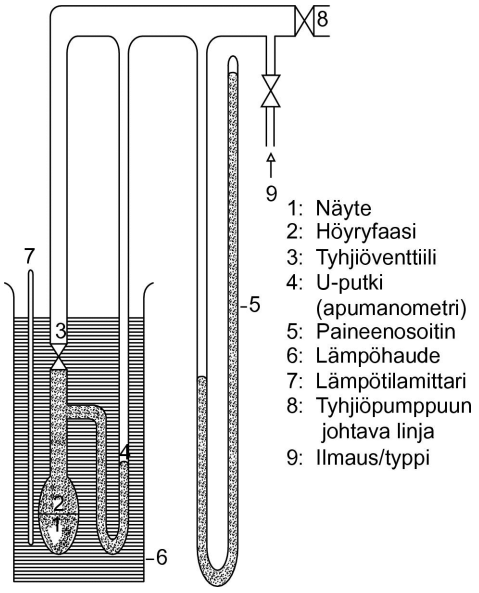
1.5.2.2 *Laite*

Laitteessa on vakiolämpöinen haude (tarkkuus ± 0,2 K), näyteastia, joka on liitetty tyhjiölinjaan, sekä manometri ja paineensäätöjärjestelmä. Näytekammio (kuva 3 a) on liitetty venttiilin välityksellä tyhjiölinjaan ja differentiaalimanometriin (sopivaa painemittarinestettä sisältävään U-putkeen), joka toimii nollaosoittimena. Differentiaalimanometrissa voidaan painealueen ja näytteen kemiallisen käyttäytymisen perusteella käyttää elohopeaa, silikoneja tai ftalaatteja. Elohopean käyttöä on kuitenkin vältettävä ympäristösyistä, jos se on mahdollista. Näyte ei saa mainittavassa määrin liueta U-putken nesteeseen tai reagoida sen kanssa. U-putken sijasta voidaan käyttää painemittaria (kuva 3 b). Manometrissa voidaan käyttää elohopeaa normaalista ilmanpaineesta 10^2 Pa:iin asti sekä silikoninesteitä ja ftalaatteja painealueella 10–10^2 Pa. Käytössä on myös muuntyyppisiä painemittareita alle 10^2 Pa:n mittauksia varten, ja kuumakalvomanometreja voidaan käyttää jopa alle 10^{-1} Pa:n paineessa. Lämpötila mitataan näyteastian ulkopuolelta tai astian sisältä.

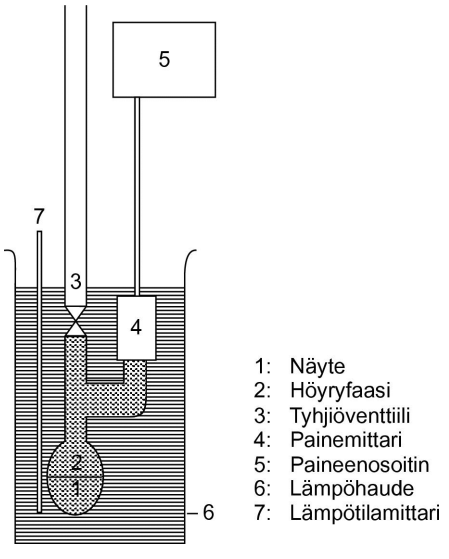
1.5.2.3 *Menettely*

Kuvan 3 a laitetta käytettäessä U-putki täytetään valitulla nesteellä, jolle on tehtävä kaasunpoisto korkeassa lämpötilassa ennen mittauksia. Näytettä pannaan laitteeseen ja sille tehdään kaasunpoisto alennetussa lämpötilassa. Jos näyte on monikomponenttinen, lämpötilan on oltava niin alhainen, ettei aineen koostumus muutu. Tasapaino voidaan saavuttaa nopeammin sekoittamalla näytettä. Näyte voidaan jäähdyttää nestemäisellä typellä tai hiilihappojäällä, mutta silloin on varottava ilmankosteuden tai pumppunesteen lauhtumista. Näyteastian venttiili avataan ja ilma poistetaan ylläpitämällä imua usean minuutin ajan. Ilmanpoisto toistetaan tarvittaessa useita kertoja.

Kuva 3 a



Kuva 3 b



▼**M1**

Kun näytettä kuumennetaan venttiilin ollessa suljettu, höyrynpaine kasvaa, mikä vaikuttaa U-putken nestepatsaan tasapainoon. Tämä kompensoidaan päästämällä typpeä tai ilmaa laitteeseen, kunnes paine-eron osoitin palaa nollaan. Tähän vaadittava paine voidaan lukea manometristä tai tarkemmasta mittauslaitteesta. Paine vastaa näytteen höyrynpainetta kyseisessä mittauslämpötilassa. Käytettäessä kuvan 3 b laitetta höyrynpaineen lukema saadaan suoraan.

Höyrynpaine määritetään sopivin lämpötilavälein (yhteensä 5–10 mittausta) haluttuun maksimilämpötilaan asti.

Alhaisen lämpötilan mittaukset on toistettava tarkistuksen vuoksi. Jos toistomittauksista saadut tulokset eivät ole yhteneviä lämpötilan noston aikana saatujen tulosten kanssa, syy voi olla jokin seuraavista:

i) Näyte sisältää vielä ilmaa (esimerkiksi aineet, joiden viskositeetti on suuri) tai alhaisessa lämpötilassa kiehuvaa ainetta, joka vapautuu kuumentamisen aikana.

ii) Näytteessä tapahtuu kemiallinen reaktio (esimerkiksi hajoaminen tai polymerisoituminen) mitattavalla lämpötila-alueella.

1.5.3 **Isoteniskooppimenetelmä**

1.5.3.1 *Periaate*

Isoteniskooppimenetelmä (6) rakentuu staattisen menetelmän periaatteelle. Menetelmässä näyte pannaan isoteniskoopin laajennukseen, jota pidetään vakiolämpötilassa. Laajennus on liitetty manometriin ja tyhjiöpumppuun. Epäpuhtaudet, jotka ovat haihtuvampia kuin näyte, poistetaan tekemällä kaasunpoisto alennetussa paineessa. Näytteen höyrynpaine valituissa lämpötiloissa saatetaan tasapainoon inertin kaasun tunnetun paineen kanssa. Isoteniskooppi kehitettiin mittaamaan tiettyjen nestemäisten hiilivetyjen höyrynpainetta, mutta se soveltuu myös kiinteiden aineiden tutkimiseen. Menetelmä ei yleensä sovellu monikomponenttijärjestelmien tutkimiseen. Haihtumattomia epäpuhtauksia sisältävistä näytteistä saaduissa tuloksissa on vain pieniä virheitä. Suositeltava mittausalue on 10^2–10^5 Pa.

1.5.3.2 *Laite*

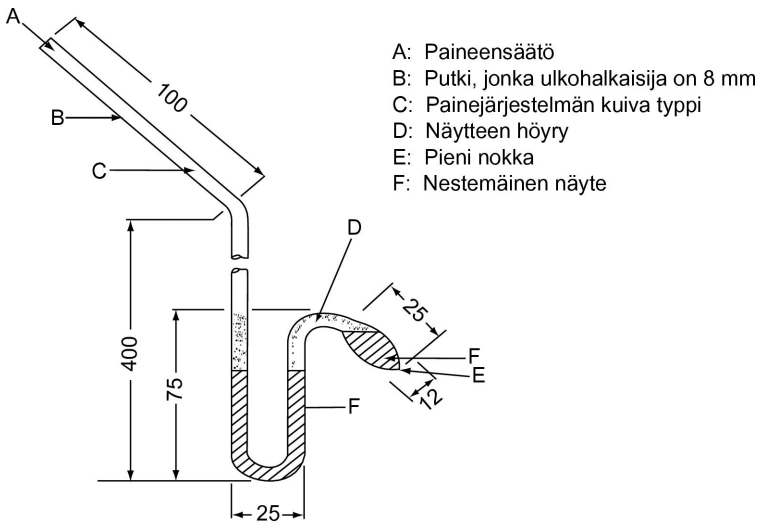
Kuvassa 4 on esimerkki mittauslaitteesta. Täydellinen kuvaus esitetään testimenetelmässä ASTM D 2879-86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3 *Menettely*

Nestemäiset näytteet toimivat samalla differentiaalimanometrin nesteenä. Isoteniskooppiin lisätään nestettä niin paljon, että sen laajennus ja manometrin lyhyempi jalka täyttyvät. Isoteniskooppi liitetään tyhjiöjärjestelmään ja siitä poistetaan ilma, minkä jälkeen se täytetään typellä. Tämä toistetaan kaksi kertaa hapenjäännösten poistamiseksi. Täytetty isoteniskooppi asetetaan vaaka-asentoon siten, että näyte leviää ohueksi kerrokseksi laajennuksessa ja manometrissa. Järjestelmän paine lasketaan arvoon 133 Pa ja näytettä kuumennetaan varovasti, kunnes se alkaa kiehua (näytteeseen liuenneiden kaasujen poisto). Isoteniskoopin asentoa muutetaan niin, että näyte palaa laajennukseen ja täyttää manometrin lyhyemmän jalan. Paine pidetään 133 Pa:ssa. Laajennuksen nokkaa kuumennetaan pienen liekin avulla, kunnes näytteestä vapautuu niin paljon höyryä, että näytettä työntyy laajennuksen yläosasta ja manometrin varresta isoteniskoopin manometriosaan, jolloin muodostuu höyrytäytteinen tila, jossa ei ole typpeä. Tämän jälkeen isoteniskooppi asetetaan hauteeseen, jonka lämpötila on vakio, ja typen painetta säädetään, kunnes se on sama kuin näytteen paine. Tässä tilanteessa typen ja näytteen höyrynpaine on sama.

Kuva 4



(Mitat millimetreinä)

Kiinteiden aineiden tutkimiseen käytetään silikoninesteiden tai ftalaattien kaltaisia manometrinesteitä. Manometrinesteen valinta riippuu kulloisestakin paine- ja lämpötila-alueesta. Manometrineste, jolle on tehty kaasunpoisto, lisätään isoteniskoopin pidemmän varren pullistumaan. Näyte pannaan laajennukseen, ja sille tehdään kaasunpoisto korkeassa lämpötilassa, minkä jälkeen isoteniskooppia kallistetaan, kunnes manometrineste virtaa U-putkeen.

▼M1

1.5.4 **Effuusiomenetelmä: höyrynpainevaaka** (7)

1.5.4.1 *Periaate*

Tutkittavasta aineesta otetaan näyte, jota kuumennetaan pienessä uunissa kelloastiassa, josta on poistettu ilma. Uuni on peitetty kannella, jossa on pieniä aukkoja, joiden halkaisijat tunnetaan. Höyry, joka vapautuu näytteestä yhden tällaisen aukon kautta, johdetaan samassa kelloastiassa olevan erittäin herkän vaa'an vaakakuppiin. Joissakin koejärjestelyissä vaakakupin ympärillä on jäähdytyslaatikko, joka johtaa lämmön ulkopuolelle. Vaakakuppi jäähdytetään säteilyn avulla, jotta vapautuva höyry tiivistyisi kupin pinnalle. Höyryvirran momentti toimii vaakaan kohdistuvana voimana. Höyrynpaine voidaan määrittää kahdella tavalla: suoraan vaakakuppiin kohdistuvasta voimasta tai haihtumisnopeudesta Hertzin ja Knudsenin yhtälön (2) avulla:

$$p = G\sqrt{\frac{2\pi RT \times 10^3}{M}}$$

jossa:

G = haihtumisnopeus (kg s^{-1} m^{-2})

M = moolimassa (g mol^{-1})

T = lämpötila (K)

R = yleinen kaasuvakio (J mol^{-1} K^{-1})

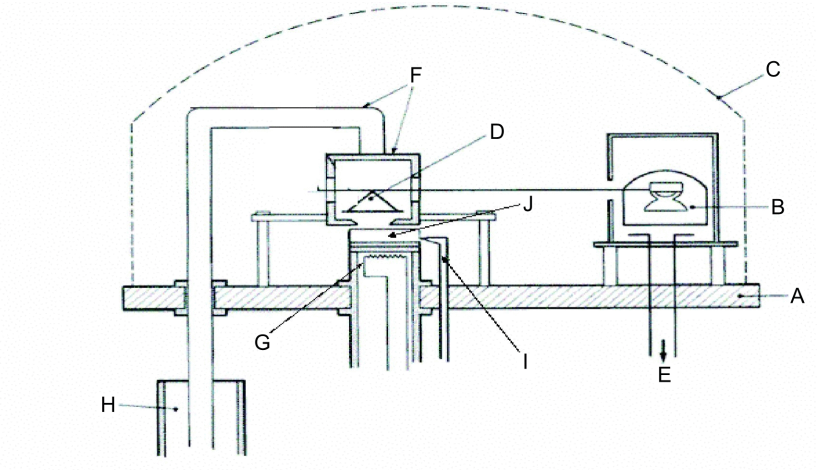
p = höyrynpaine (Pa)

Suositeltava mittausalue on 10^{-3}–1 Pa.

1.5.4.2 *Laite*

Kuva 5 havainnollistaa laitteen yleistä periaatetta.

Kuva 5



A: Aluslevy

B: Kiertokäämimittari

C: Kelloastia

D: Vaaka ja vaakakuppi

E: Tyhjiömittari

F: Jäähdytyslaatikko ja kylmätanko

G: Haihdutusuuni

H: Dewar-astia, jossa on nestemäistä typpeä

I: Näytteen lämpötilan mittaus

J: Näyte

▼**M1**

1.5.5 **Effuusiomenetelmä: Knudsen-kenno**

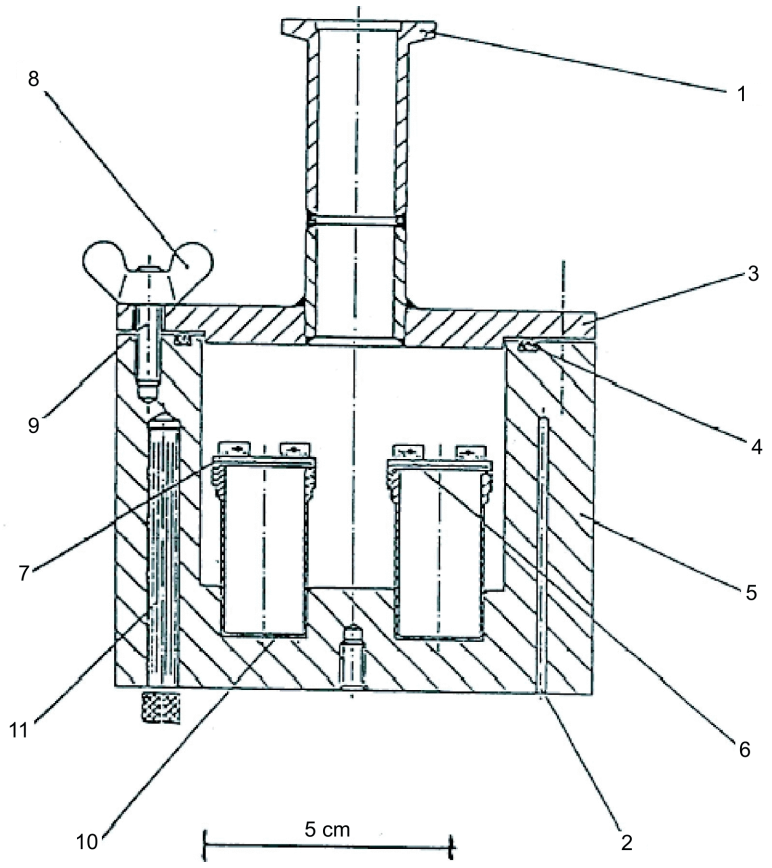
1.5.5.1 *Periaate*

Menetelmä perustuu Knudsen-kennosta (8) aikayksikköä kohti virtaavan, höyrymäisen näytteen massan mittaamiseen. Virtaus tapahtuu mikroaukon läpi ultratyhjiössä. Ulos virtaavan höyryn massa saadaan joko määrittämällä kennon painohäviö tai tiivistämällä höyry alhaisessa lämpötilassa, minkä jälkeen höyrystyneen aineen määrä voidaan määrittää kromatografian avulla. Höyrynpaine lasketaan Hertzin ja Knudsenin yhtälön avulla (ks. kohta 1.5.4.1) käyttämällä korjauskertoimia, jotka riippuvat laitteen parametreista (9). Suositeltava mittausalue on 10^{-10}–1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2 *Laite*

Kuva 6 havainnollistaa laitteen yleistä periaatetta.

Kuva 6



1: Tyhjiöliitäntä

2: Suojatasku platinavastuslämpömittaria tai lämpötilan mittausta ja säätöä varten

3: Tyhjiösäiliön kansi

4: O-rengas

5: Tyhjiösäiliö (alumiinia)

6: Effuusiokennojen asetus- ja poistolaite

7: Kierrekansi

8: Siipimutterit

9: Pultit

10: Effuusiokennot (ruostumatonta terästä)

11: Lämpöpatruuna

▼M1

1.5.6 **Effuusiomenetelmä: isoterminen termogravimetria**

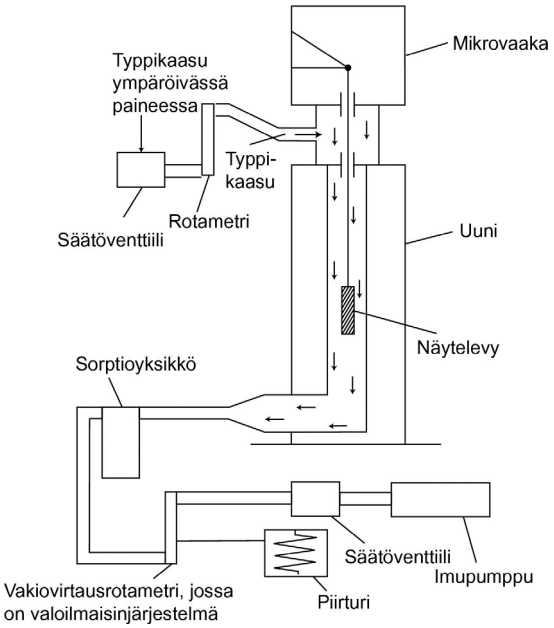
1.5.6.1 *Periaate*

Menetelmässä määritetään näytteen kiihdytetyt haihtumisnopeudet korkeissa lämpötiloissa ja ympäröivässä paineessa termogravimetrian avulla (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Haihtumisnopeudet v_T saadaan käsittelemällä valittua ainetta hitaasti virtaavalla inertillä kaasulla ja rekisteröimällä painohäviö tietyissä isotermisissä lämpötiloissa T (kelvineinä) tiettyjen ajanjaksojen kuluessa. Höyrynpaineet p_T lasketaan v_T-arvoista höyrynpaineen logaritmin ja haihtumisnopeuden logaritmin lineaarisen suhteen perusteella. Tarvittaessa voidaan tehdä ekstrapolointi lämpötiloihin 20 ja 25 °C tekemällä regressioanalyysi logaritmista p_T lämpötilan käänteisarvon 1/T suhteen. Menetelmällä voidaan tutkia aineita, joiden höyrynpaine voi olla niinkin alhainen kuin 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar). Tutkittavien aineiden puhtauden on oltava niin lähellä 100:aa prosenttia kuin mahdollista, jotta mitattuja painohäviöitä ei tulkittaisi väärin.

1.5.6.2 *Laite*

Kuva 7 havainnollistaa koejärjestelyn yleistä periaatetta.

Kuva 7



Lämpötilaohjatussa kammiossa olevaan mikrovaakaan ripustetun näytelevyn yli virtaa kuiva typpikaasu, joka kantaa näytteen höyrystyneet molekyylit mukanaan. Tultuaan ulos kammiosta kaasuvirta puhdistuu sorptioyksikössä.

1.5.6.3 *Menettely*

Näyte levitetään karhennetun lasilevyn pintaan tasaiseksi kerrokseksi. Jos näyte on kiinteä, se liuotetaan sopivalla liuottimella ja liuosta levitetään tasaisesti näytelevylle, joka kuivataan inertissä ympäristössä. Näin käsitelty levy ripustetaan mittausta varten termogravimetriseen analysaattoriin, ja sen painohäviötä mitataan jatkuvasti ajan funktiona.

▼M1

Haihtumisnopeus v_T tietyssä lämpötilassa lasketaan näytelevyn painohäviöstä Δm seuraavalla kaavalla:

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} \ (gcm^{-2}h^{-1})$$

jossa F on levitetyn näytteen pinta-ala (yleensä näytelevyn pinta-ala) ja t on painohäviön Δm vaatima aika.

Höyrynpaine p_T lasketaan haihtumisnopeuden v_T funktiona seuraavan kaavan mukaan:

$$\text{Log } p_T = C + D \log v_T$$

jossa C ja D ovat koejärjestelykohtaisia vakioita, jotka riippuvat mittauskammion halkaisijasta ja kaasun virtausnopeudesta. Vakiot on määritettävä kerran mittaamalla sarja yhdisteitä, joiden höyrynpaineet tiedetään, ja tekemällä regressio, jossa log v_T riippuu log p_T:stä (11)(21)(22).

Höyrynpaineen p_T ja kelvineinä ilmaistun lämpötilan T välinen suhde on seuraava:

$$\text{Log } p_T = A + B \ 1/T$$

jossa A ja B ovat vakioita, jotka on saatu muuttujien log p_T ja 1/T välisestä regressiosta. Yhtälön avulla voidaan laskea mitä tahansa lämpötilaa vastaava höyrynpaine käyttämällä ekstrapolointia.

1.5.7 **Kaasunkyllästysmenetelmä** (23)

1.5.7.1 *Periaate*

Inerttiä kaasua johdetaan huoneenlämpötilassa tietyllä virtausnopeudella näytteen läpi tai yli siten, että näytteen höyry ehtii kyllästää kaasun. Kaasufaasin kyllästyminen on ratkaisevan tärkeää. Kaasun kuljettama aine kerätään talteen, yleensä sorbentin avulla, ja sen määrä mitataan. Höyryn keräämisen ja sitä seuraavan analyysin sijasta kuljetettu ainemäärä voidaan määrittää myös suora-analyysin (esimerkiksi kromatografian) avulla. Höyrynpaine lasketaan olettaen, että ideaalikaasulaki on voimassa ja että kaasuseoksen kokonaispaine on yhtä kuin seoksessa olevien kaasujen paineiden summa. Näytteen osapaine eli höyrynpaine lasketaan kaasujen tunnetun kokonaistilavuuden ja kuljetetun aineen painon avulla.

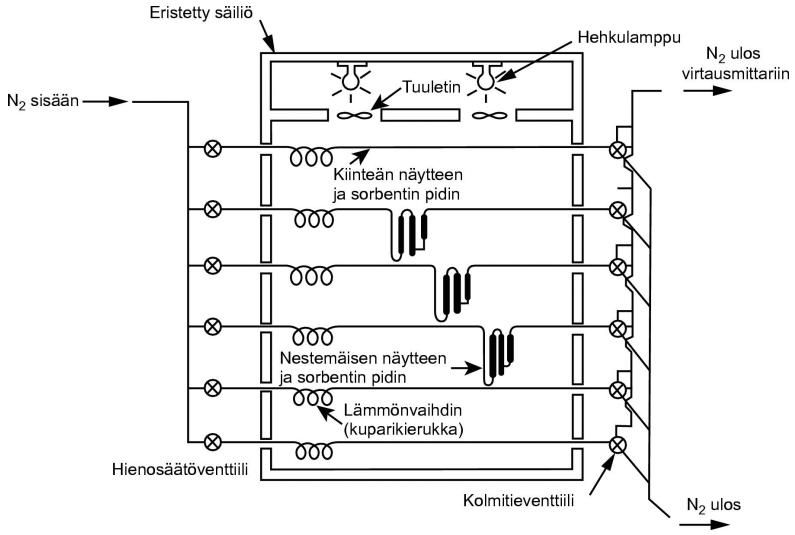
Kaasunkyllästysmenetelmä soveltuu kiinteiden ja nestemäisten aineiden tutkimiseen. Sillä voidaan mitata höyrynpaineita arvoon 10^{-10} Pa saakka (10)(11)(12)(13)(14). Menetelmä on kaikkein luotettavin mitattaessa alle 10^3 Pa:n höyrynpaineita. Tätä suuremmilla arvoilla höyrynpaineet arvioidaan yleensä liian suuriksi, todennäköisesti aerosolien muodostumisen vuoksi. Koska höyrynpaineen mittaukset tehdään huoneenlämpötilassa, ei ole tarpeen ekstrapoloida korkeampia lämpötiloja koskevia tietoja. Tällaista ekstrapolointia vältetään, koska se voi aiheuttaa vakavia virheitä.

1.5.7.2 *Laite*

Menetelmässä käytetään säiliötä, jonka lämpötila on vakio. Kuvan 8 piirros esittää säiliötä, joka sisältää kolme kiinteän näytteen ja kolme nestemäisen näytteen pidintä. Niiden avulla kiinteästä tai nestemäisestä näytteestä voidaan tehdä kolme analyysiä. Lämpötila säädetään ± 0,5 °C:n tarkkuudella tai tarkemmin.

▼**M1**

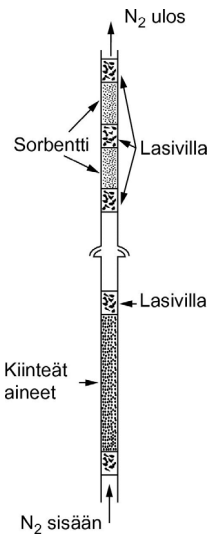
Kuva 8



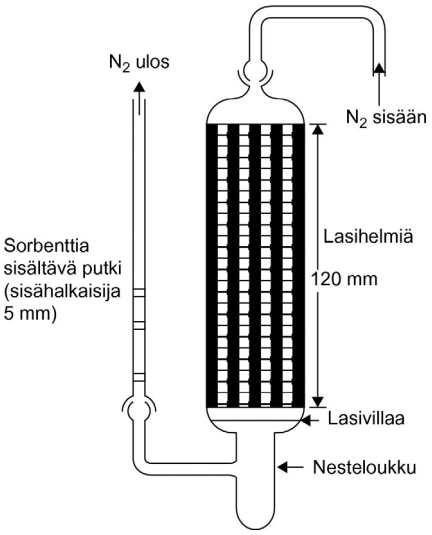
Inerttinä kantokaasuna käytetään yleensä typpeä, mutta joskus voidaan tarvita muutakin kaasua (24). Kantokaasun on oltava kuiva. Kaasuvirta jaetaan kuudeksi osavirraksi, joita säädetään neulaventtiileillä (aukot noin 0,79 mm) ja jotka johdetaan säiliöön kupariputkien kautta (sisähalkaisija 3,8 mm). Lämpötilatasoituksen jälkeen kaasu virtaa näytteen ja sorbenttiloukun läpi ja sen jälkeen ulos säiliöstä.

Kiinteä näyte pannaan lasiputkeen, jonka sisähalkaisija on 5 mm ja jossa on näytteen molemmin puolin lasivillatulpat (ks. kuva 9). Kuva 10 esittää nestemäisen näytteen pidintä ja sorbenttijärjestelmää. Nesteiden höyrynpaineiden mittauksissa parhaiten toistettavissa oleva menetelmä on valaa nestettä lasihelmien tai inertin sorbentin, kuten piidioksidin päälle ja täyttää näytteenpidin näillä helmillä. Vaihtoehtona on antaa kantokaasun kulkea karkean fritin kautta ja kuplia nestemäistä näytettä sisältävän kolonnin läpi.

Kuva 9



Kuva 10



▼M1

Sorbenttijärjestelmässä on etummainen ja takimmainen sorptio-osa. Hyvin alhaisilla höyrypaineilla sorbentti pidättää vain pieniä ainemääriä, jolloin adsorboituminen lasivillaan sekä näytteen ja sorbentin välisen lasiputken seiniin voi olla vakava ongelma.

Toinen tehokas tapa kerätä höyrystynyt materiaali talteen on käyttää loukkuja, jotka jäähdytetään hiilihappojäällä. Ne eivät aiheuta kyllästymiskolonniin kohdistuvaa vastapainetta, ja niihin jääneen ainemäärän kerääminen on helppoa.

1.5.7.3 *Menettely*

Ulos virtaavan kantokaasun virtausnopeus mitataan huoneenlämpötilassa. Virtausnopeus tarkistetaan useita kertoja kokeen aikana, jotta kantokaasun kokonaistilavuudesta saadaan luotettava arvo. Jatkuva mittaus massavirtausmittarin avulla on suositeltavaa. Kaasufaasin kyllästyminen voi vaatia huomattavan pitkän kontaktiajan, minkä vuoksi kaasun virtausnopeuden on oltava suhteellisen pieni (25).

Kokeen lopussa sorbenttijärjestelmän molemmat osat analysoidaan erikseen. Niissä olevat aineet desorboidaan lisäämällä liuotinta. Näin saadut liuokset analysoidaan kvantitatiivisesti, jotta voidaan määrittää kummastakin osasta desorboituneen ainemäärän paino. Analyysimenetelmän (kuten myös sorbentin ja desorboivan liuottimen) valinta riippuu näytteen ominaisuuksista. Desorption tehokkuus määritetään ruiskuttamalla tunnettu määrä näytettä sorbenttiin, desorboimalla se ja analysoimalla näin saatu määrä. On tärkeää, että desorption tehokkuus tarkistetaan käyttämällä pitoisuutta, joka on sama tai lähes sama kuin näytteen pitoisuus koeolosuhteissa.

Kantokaasun kyllästyminen tutkittavalla aineella varmistetaan käyttämällä kolmea eri kaasunvirtausnopeutta. Kaasun oletetaan olevan kyllästynyt, jos laskettu höyrynpaine ei muutu eri virtausnopeuksilla.

Höyrynpaine lasketaan seuraavan kaavan avulla:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

jossa

p = höyrynpaine (Pa)

W = haihdutetun näytteen massa (g)

V = kyllästetyn kaasun tilavuus (m^3)

R = yleinen kaasuvakio (8,314 J mol^{-1} K^{-1})

T = lämpötila (K)

M = näytteen moolimassa (g mol^{-1}).

Mitatut tilavuudet on korjattava virtausmittarin ja kyllästimen välisten paine- ja lämpötilaerojen suhteen.

▼M1

1.5.8 **Pyörivä roottori**

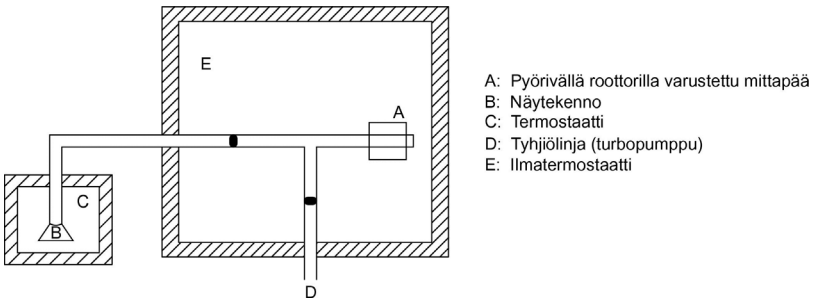
1.5.8.1 *Periaate*

Menetelmässä käytetään pyörivään roottoriin perustuvaa viskositeettimittaria, jossa mittauselementtinä on pieni teräspallo, joka leijuu magneettikentässä ja pyörii pyörivien kenttien vaikutuksesta (26)-(27)(28). Pallon pyörimisnopeus saadaan anturikelojen avulla. Kun pallo on saavuttanut tietyn pyörimisnopeuden (yleensä noin 400 kierrosta sekunnissa), magnetointi lopetetaan, jolloin pyöriminen hidastuu kaasukitkan vaikutuksesta. Pyörimisnopeuden pieneneminen mitataan ajan funktiona. Höyrynpaine voidaan päätellä määrittämällä teräspallon nopeuden pieneneminen paineen vaikutuksesta. Suositeltava mittausalue on 10^{-4}–0,5 Pa.

1.5.8.2 *Laite*

Laitteen periaatepiirros on kuvassa 11. Mittapää on suljettu vakiolämpöiseen tilaan (säätötarkkuus 0,1 °C). Näytesäiliö asetetaan erilliseen koteloon (säätötarkkuus jälleen 0,1 °C), ja järjestelmän kaikkia muita osia pidetään lämmitettyinä tiivistymisen estämiseksi. Koko laite on liitetty tyhjiöjärjestelmään.

Kuva 11



2. **TIEDOT JA NIIDEN RAPORTOIMINEN**

2.1 TIEDOT

Kaikissa edellä kuvatuissa menetelmissä höyrynpaine määritetään vähintään kahdessa lämpötilassa. Lämpötila-alueella 0–50 °C suositellaan vähintään kolmea mittausta, jotta höyrynpainekäyrän lineaarisuus voitaisiin tarkistaa. Käytettäessä effuusiomenetelmää (Knudsen-kennoa tai isotermistä termogravimetriaa) tai kaasunkyllästysmenetelmää mittausten lämpötila-alueeksi suositetaan alueen 0–50 °C sijasta aluetta 120–150 °C.

2.2 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä,

▼**M1**

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset,

— vähintään kaksi höyrynpaine- ja lämpötila-arvoa – ja mieluiten kolme tai enemmän – alueelta 0–50 °C (tai 120–150 °C),

— lämpötila-arvoista ainakin yhden on oltava 25 °C tai vähemmän, jos se on valitussa menetelmässä teknisesti mahdollista,

— kaikki lähtöarvot,

— käyrä, joka kuvaa log p:n ja lämpötilan käänteisarvon 1/T välistä riippuvuutta,

— arvio höyrynpaineesta 20 tai 25 °C:n lämpötilassa.

Jos aineessa tapahtuu muutoksia (olomuodon muutos, hajoaminen), on lisäksi ilmoitettava:

— muutoksen luonne,

— lämpötila, jossa muutos tapahtui ilmakehän paineessa,

— höyrynpaine 10 °C ja 20 °C muutoslämpötilan alapuolella sekä 10 °C ja 20 °C tämän lämpötilan yläpuolella (ellei kyseessä ole muutos kiinteästä olomuodosta kaasuksi).

Raportissa on esitettävä myös kaikki sellaiset tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

3. **KIRJALLISUUS**

(1) *Euroopan yhteisöjen virallinen lehti* L 383 A, s. 26–47 (1992).

(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, Lontoo.

(3) Weissberger R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

(4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

(5) NF T 20–048 AFNOR (syyskuu 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^{5} Pa – Static method.

(6) ASTM D 2879–86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(7) NF T 20–047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

▼M1

(8) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

(9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

(10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521–532.

(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, kahdestoista laitos (2000).

(12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22–28.

(13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269–278.

(14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117–122.

(15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137–147.

(16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974), 393–400.

(17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) 161–168.

(18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) 27–31.

(19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300–310.

(20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87-(12) (1998) 1512–20.

(21) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.

(22) Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

(23) 40 CFR, 796. (1993). s. 148–153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

(24) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

(25) Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

(26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

(27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

(28) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

▼**M1**

Lisäys

Arviointimenetelmä

JOHDANTO

Höyrynpaineen arvioituja arvoja voidaan käyttää, kun halutaan:

— päättää, mikä kokeellisista menetelmistä on sopiva,

— saada arvio tai raja-arvo tapauksissa, joissa kokeellista menetelmää ei voida käyttää teknisistä syistä.

ARVIOINTIMENETELMÄ

Nesteiden ja kiinteiden aineiden höyrynpaine voidaan arvioida muunnetun Watson-korrelaation (a) avulla. Ainoa tarvittava kokeellinen tieto on normaali kiehumispiste. Menetelmää voidaan käyttää painealueella 10^5–10^{-5} Pa.

Tarkemmat tiedot menetelmästä esitetään kirjassa ”Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (b). Ks. myös OECD Environmental Monograph No.67 (c).

LASKENTA

Höyrynpaine lasketaan seuraavasti:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1}\ln\frac{T}{T_b}\right]$$

jossa

T = kyseinen lämpötila

T_b = normaali kiehumispiste

P_{vp} = höyrynpaine lämpötilassa T

ΔH_{vb} = höyrystymislämpö

ΔZ_b = puristuvuustekijä (arvioitu arvo 0,97)

m = empiirinen kerroin, joka vaihtelee fysikaalisen olomuodon mukaan kyseisessä lämpötilassa.

Lisäksi

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F\,(8,75 + R\ln T_b)$$

jossa K_F on empiirinen vakio, jolla otetaan huomioon aineen polaarisuus. Viitteessä (b) on lueteltu K_F-vakiot useille sekoitetyypeille.

▼**M1**

Usein on saatavana tietoja kiehumispisteestä alennetussa paineessa. Tällöin höyrynpaine voidaan viitteen (b) mukaan laskea seuraavasti:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{vl}}{\Delta Z_b R T_l}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1}\right]$$

jossa T_1 on kiehumispiste alennetussa paineessa P_1.

RAPORTTI

Arviointimenetelmää käytettäessä raportissa on esitettävä yksityiskohtaiset selvitykset laskennasta.

KIRJALLISUUS

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OECD Environmental Monograph No.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5 PINTAJÄNNITYS

1. MENETELMÄ

Tässä kuvatut menetelmät perustuvat OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteessä (2).

1.1 JOHDANTO

Kuvattuja menetelmiä voidaan soveltaa vesiliuosten pintajännityksen mittaamiseen.

On suositeltavaa selvittää ensin tutkittavan aineen vesiliukoisuus, rakenne, hydrolysoitumisominaisuudet ja misellimuodostuksen kriittinen pitoisuus.

Kuvattuja menetelmiä voidaan käyttää lähes kaikkiin kemiallisiin aineisiin ilman rajoituksia aineiden puhtausasteen suhteen.

Pintajännityksen mittaaminen rengastensiometrillä on rajoitettu vesiliuoksiin, joiden dynaaminen viskositeetti on alle 200 mPa s.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Vapaan pinnan entalpiaa pintayksikköä kohti kutsutaan pintajännitykseksi.

Pintajännityksen yksiköt ovat seuraavat:

N/m (SI-yksikkö) tai

mN/m (SI-alayksikkö)

1 N/m = 10^3 dyniä/cm

1 mN/m = 1 dyni käytöstä poistuneessa cgs-järjestelmässä

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

Viitteissä (1) ja (3) esitetään vertailuaineita, jotka kattavat laajan pintajännitysalueen.

1.4 TESTIMENETELMIEN PERIAATTEET

Menetelmä perustuu sen pystysuoran vetovoiman mittaamiseen, joka tarvitaan erottamaan sanka tai rengas mitta-astiassa olevan tutkittavan nesteen pinnasta vetämällä kohtisuoraan ylöspäin. Voidaan myös panna neste lautaselle ja mitata voima, joka tarvitaan kappaleen reunan ja nestepinnan välisen kalvon irrottamiseen.

Aineet, joiden vesiliukoisuus on vähintään 1 mg/l, tutkitaan vesiliuoksessa yhtenä ainoana pitoisuutena.

1.5 LAATUKRITEERIT

Menetelmillä on mahdollista saavuttaa tarkkuus, joka on todennäköisesti suurempi kuin mitä ympäristöllisiä arviointeja varten tarvitaan.

▼B

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

Ainetta liuotetaan tislattuun veteen. Liuoksen pitoisuuden tulee olla 90 % aineen kyllästymispitoisuudesta veteen liuotettaessa. Jos kyllästymispitoisuus ylittää arvon 1 g/l, testiin käytetään pitoisuutta 1 g/l. Aineita, joiden vesiliukoisuus on alle 1 mg/l, ei tarvitse testata.

1.6.1 **Lautasmenetelmä**

Katso standardeja ISO 304 ia NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films)

1.6.2 **Sinkilämenetelmä**

Katso standardeja ISO 304 ja NF T 73-060 {Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films)

1.6.3 **Rengasmenetelmä**

Katso standardeja ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films)

1.6.4 **OECD-maiden yhtenäistetty rengasmenetelmä**

1.6.4.1 *Laite*

Tähän mittaukseen voidaan käyttää kaupallisesti saatavia tensiometrejä. Tensiometrin osat ovat seuraavat:

— liikkuva näytepöytä,

— mittauskappale (rengas),

— voimanmittausjärjestelmä,

— mittausastia.

1.6.4.1.1 Liikkuva näytepöytä

Liikkuva näytepöytä toimii näytettä paikallaanpitävän, termostaatilla varustetun mittausastian tukena. Näytepöytä ja voimanmittausjärjestelmä on kiinnitetty telineeseen.

1.6.4.1.2 Voimanmittausjärjestelmä

Voimanmittausjärjestelmä (katso kuvaa) sijaitsee näytepöydän yläpuolella. Voimanmittauksen virhe ei saa ylittää arvoa ± 10^{-6} N, mikä vastaa virherajaa ± 0,1 mg massamittauksissa. Useimmissa tapauksissa kaupallisten tensiometrien mitta-asteikko on mN/m-yksikköinä, jolloin pintajännityslukema saadaan suoraan mN/m-yksikköinä 0,1 mN/m:n tarkkuudella.

▼B

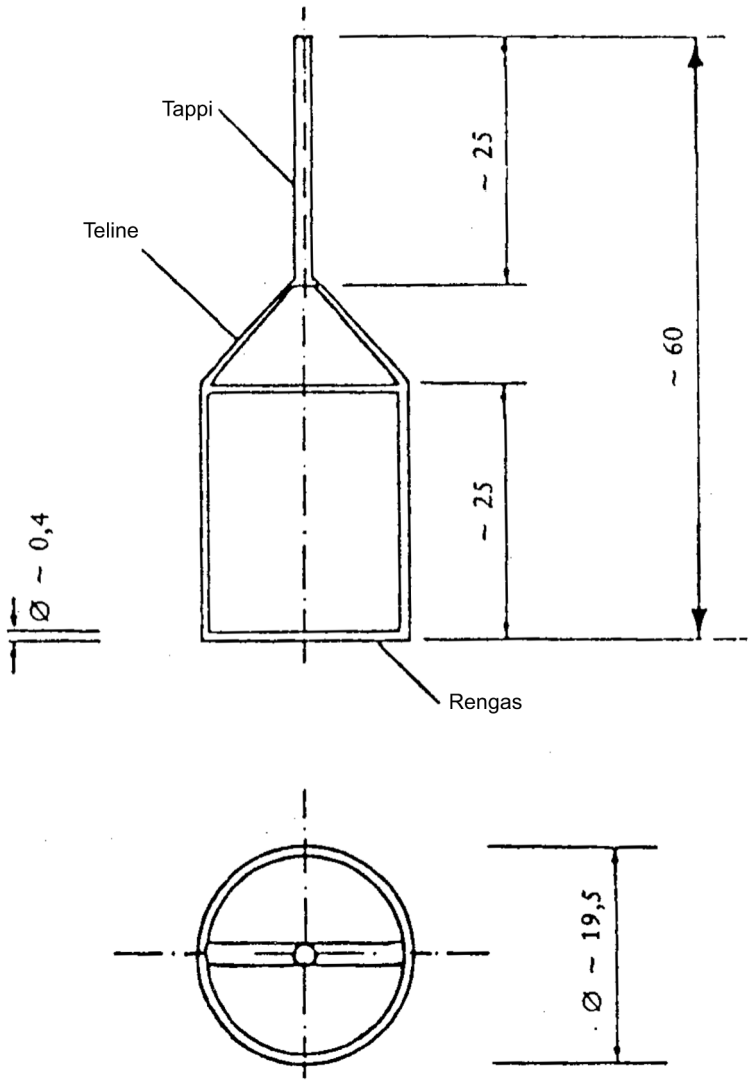
1.6.4.1.3 Mittauskappale (rengas)

Rengas on yleensä tehty noin 0,4 mm:n paksuisesta platina-iridium-langasta. Keskiympärysmitta on 60 mm. Rengas riippuu vaakasuorassa metallitapista ja lankatelineestä ja on tätä kautta yhteydessä voimanmittausjärjestelmään (katso kuvaa).

Kuva

Mittauskappale

(Kaikki mitat ovat millimetreinä.)



1.6.4.1.4 Mittausastia

Näyteliuosta sisältävän mittausastian on oltava termostaatilla varustettu ja lasista valmistettu. Astian tulee olla siten muotoiltu, että näyteliuoksen ja sen yläpuolella olevan kaasufaasin lämpötila pysyy mittauksen aikana vakiona eikä näytettä pääse haihtumaan. Hyväksyttävän sylinterinmuotoisen mittausastian sisähalkaisijan on oltava vähintään 45 mm.

▼B

1.6.4.2 *Valmistelutoimet*

1.6.4.2.1 Puhdistus

Lasiastiat on puhdistettava huolella. Tarvittaessa ne on pestävä kuumalla kromi-rikkihapolla ja sen jälkeen väkevällä fosforihapolla (83–98 painoprosenttia H_3PO_4:ää), ja sen jälkeen huuhdeltava huolellisesti vesijohtovedellä. Lopuksi astiat on pestävä kaksoistislatulla vedellä, niin että saadaan neutraali reaktio, ja kuivattava, tai huuhdeltava pienellä määrällä näyteliuosta.

Rengas huuhdellaan ensin huolellisesti vedellä kaikkien vesiliukoisten aineiden poistamiseksi. Tämän jälkeen se upotetaan hetkeksi kromi-rikkihappoon, ja sitten se pestään kaksoistislatulla vedellä, niin että saadaan neutraali reaktio. Lopuksi rengasta kuumennetaan vähän aikaa metanoliliekin yllä.

Huomautus:

Epäpuhtaudet, jotka eivät liukene tai tuhoudu kromi-rikkihapon tai fosforihapon vaikutuksesta, poistetaan sopivalla orgaanisella liuottimella.

1.6.4.2.2 Laitteen kalibrointi

Laite kalibroidaan vahvistamalla nollapiste ja säätämällä se siten, että instrumentin lukema sallii luotettavan mN/m-lukeman määrityksen.

Asennus:

Laite tasapainotetaan esimerkiksi tensiometrin jalustalla olevan vesiva'an avulla. Jalustan tasapainotusruuveja säädetään tarpeen mukaan.

Nollapisteen säätö:

Kun rengas on kiinnitetty laitteeseen, tensiometrin lukema on ennen mittauksia säädettävä nollaan ja renkaan yhdensuuntaisuus nesteen pinnan suhteen on tarkistettava. Nesteen pintaa voidaan käyttää peilinä.

Kalibrointi:

Varsinainen kalibrointi voidaan tehdä jollakin seuraavista menetelmistä:

a) Massamenetelmä: Renkaalle asetetaan kappaleita, joiden massa on tunnettu (0,1–1,0 g). Kalibrointikerroin ($\Phi_{a)}$, jolla instrumentin kaikki lukemat on kerrottava, määritetään yhtälön (1) mukaisesti:

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

jossa

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = kappaleen massa (g)

g = putoamiskiihtyvyys (981 cm s^{-2} merenpinnan tasolla)

b = renkaan keskiympärysmitta (cm)

σ_a = tensiometrin lukema, kun renkaalle on asetettu kappaleita (mN/m).

▼B

b) Vesimenetelmä: Käytetään vettä, jonka pintajännitys esimerkiksi 23 °C:ssa on 72,3 mN/m. Menetelmä on nopeampi kuin painokalibrointi, mutta siihen liittyy vaara veden pintajännitysarvon vääristymisestä pinta-aktiivisten epäpuhtauksien vaikutuksesta.

Kalibrointikerroin (Φ_b), jolla instrumentin kaikki lukemat on kerrottava, määritetään yhtälön (2) mukaisesti:

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

jossa

σ_o = lähdekirjallisuudesta saatu veden pintajännityksen arvo (mN/m)

o_g = veden pintajännityksen mitattu arvo (mN/m) molemmat samassa lämpötilassa.

1.6.4.3 *Näytteiden valmistelu*

Näytteistä valmistetaan vaadittavan pitoiset vesiliuokset, jotka eivät saa sisältää liukenemattomia aineita.

Liuosten lämpötila on pidettävä vakiona (± 0,5 °C). Koska mittausastiassa olevan liuoksen pintajännitys muuttuu ajan kuluessa, on tehtävä useita mittauksia eri ajankohtina ja tuloksista on piirrettävä käyrä, joka ilmaisee pintajännityksen muuttumisen ajan funktiona. Kun muutoksia ei enää tapahdu, järjestelmä on saavuttanut tasapainon.

Pölyt ja muiden aineiden kaasumaiset epäpuhtaudet häiritsevät mittauksia. Siksi mittaukset on suoritettava suojan alla.

1.6.5 **Testiolosuhteet**

Mittaukset tehdään noin 20 °C:ssa. Lämpötila on säädettävä ± 0,5 °C:n tarkkuudella.

1.6.6 **Työjärjestys**

Näyteliuokset kaadetaan huolella puhdistettuun mittausastiaan välttäen tarkoin vaahdon muodostumista. Mittausastia asetetaan laitteen pöydälle. Pöytää mittausastioineen nostetaan, kunnes rengas on kokonaan näyteliuoksen pinnan alla. Tämän jälkeen pöytää lasketaan hitaasti ja tasaisesti (noin 0,5 cm minuutissa), niin että saavutetaan maksimivoima renkaan noustessa pintaan irtoamatta siitä ja pintaa yhdistävästä vesikerroksesta. Mittauksen jälkeen rengas lasketaan uudelleen pinnan alle ja mittauksia toistetaan, kunnes pintajännitysarvo ei enää muutu. Jokaisen mittauksen yhteydessä rekisteröidään aika, joka on kulunut näyteliuoksen kaatamisesta mittausastiaan. Mittaustulokseksi valitaan maksimivoima, joka tarvitaan nostamaan rengas nesteen pinnan yläpuolelle.

▼B

2. **TIEDOT**

Yksikkönä mN/m saadut mittaustulokset kerrotaan ensin kalibrointikertoimella Φ_a tai Φ_b (käytetyn kalibrointimenetelmän mukaan). Näin saadaan kuitenkin vain likiarvo, jota on vielä korjattava.

Harkins ja Jordan (4) ovat määritelleet empiirisesti korjauskertoimia rengasmenetelmällä mitatuille arvoille renkaan mittojen, nesteen tiheyden ja pintajännityksen mukaan.

Koska korjauskertoimen määritys Harkinsin ja Jordanin taulukosta jokaista yksittäistä mittausta varten on työlästä, voidaan vesiliuosten pintajännityksen laskemista varten käyttää yksinkertaistettua menetelmää, jossa korjatut pintajännitysarvot luetaan suoraan taulukosta. (Väliarvoja varten käytetään interpolointia.)

Taulukko

Mitatun pintajännityksen korjaaminen

Vain vesiliuoksille, joiden tiheys on noin 1 g/cm^3

R	= 9,55 mm (renkaan säteen keskiarvo)
r	= 0,185 mm (renkaan langan säde)

Kokeellinen arvo (mN/m)	Korjattu arvo (mN/m)	
	Painokalibroint (katso 1.6.4.2.2 i (a))	Vesikalibrointi (katso 1.6.4.2.2 (b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Kokeellinen arvo (mN/m)	Korjattu arvo (mN/m)	
	Painokalibroint (katso 1.6.4.2.2 i (a))	Vesikalibrointi (katso 1.6.4.2.2 (b))
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Taulukko perustuu Harkinsin-Jordanin korjaukseen. Taulukko vastaa vettä ja vesiliuoksia käsittelevän DIN-standardin (DIN 53914) taulukkoa (tiheys = 1 g/cm^3). Se on tarkoitettu mittauksiin, joissa käytetään kaupallista rengasta, jonka mitat ovat R = 9,55 mm (renkaan säteen keskiarvo) ja r = 0,185 mm (renkaan langan säde). Taulukossa on pintajännitysmittauksien korjatut arvot, jotka tehdään paino- tai vesikalibroinnin jälkeen.

Vaihtoehtoisesti pintajännitys, joka on mitattu ilman ensin tehtyä kalibrointia, voidaan laskea seuraavan suureyhtälön mukaan:

$$\sigma = \frac{fxF}{4\pi R}$$

jossa

F = dynamometrin mittaama voima kalvon murtuessa

R = renkaan säde

f = korjauskerroin (1)

3. RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä,

— käytetyn veden tai liuoksen tyyppi,

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet),

— mittaustulokset: pintajännitys (lukema); ilmoitetaan sekä yksilölliset lukemat aritmeettisine keskiarvoineen että korjattu keskiarvo (laitekerroin ja korjaustaulukko huomioon ottaen),

▼B

— liuoksen pitoisuus,

— testilämpötila,

— liuoksen ikä; erityisesti aika liuoksen valmistelusta mittaushetkeen,

— selvitys liuoksen pintajännityksen verrannollisuudesta aikaan siitä hetkestä lähtien, jolloin liuos on siirretty mittausastiaan,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Koska tislatun veden pintajännitys on 20 °C:ssa 72,75 mN/m, aineet, joiden pintajännitys on alle 60 mN/m kuvatun menetelmän kaltaisissa olosuhteissa, on katsottava pinta-aktiivisiksi aineiksi.

4. **VIITTEET**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of organic chemistry, Chapter XIV, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Interscience Publ. New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.

(4) Harkins, W. D., Jordan, H. E, J. Amer. Chem. Soe, 1930, vol. 52, 1751.

▼M4

A.6 **VESILIUKOISUUS**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 105 (1995). Tämä testimenetelmä on tarkistettu versio alkuperäisestä testiohjeesta nro 105, joka hyväksyttiin vuonna 1981. Nykyisen version ja vuoden 1981 version välillä ei ole merkittävää eroa, pääosin vain muotoa on muutettu. Tarkistus perustui EU:n testimenetelmään ”Vesiliukoisuus” ([1]).

ALUSTAVAT HUOMIOT

2. Epäpuhtaudet voivat vaikuttaa aineen vesiliukoisuuteen huomattavasti. Tällä testimenetelmällä määritetään sellaisten aineiden vesiliukoisuus, jotka ovat huomattavan puhtaita sekä stabiileja vedessä, eivät siis haihtuvia. Ennen vesiliukoisuuden määrittämistä on suositeltavaa hankkia testiaineesta joitakin alustavia tietoja, kuten rakennekaava, höyrynpaine, dissosiaatiovakio ja hydrolyysi pH:n funktiona.

3. Tässä testimenetelmässä kuvataan kaksi menetelmää, kolonnieluutiomenetelmä ja pullomenetelmä. Näitä menetelmiä voidaan soveltaa aineisiin, joiden liukoisuus on yli ja alle 10^{-2} grammaa litraa kohti (g/l). Lisäksi kuvataan yksinkertainen alustava testi. Sen avulla voidaan määrittää lopullisessa testissä käytettävä näytemäärä suurin piirtein sekä kyllästymisen saavuttamiseen tarvittava aika.

MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

4. Aineen vesiliukoisuus on sen kyllästyspitoisuus vedessä määrätyssä lämpötilassa.

5. Vesiliukoisuus ilmoitetaan liuenneen aineen massana liuostilavuutta kohti. SI-yksikkö on kg/m^3, mutta myös yksikköä g/l voidaan käyttää.

VERTAILUKEMIKAALIT

6. Testiainetta tutkittaessa ei tarvitse käyttää vertailukemikaaleja.

MENETELMIEN KUVAUS

Testiolosuhteet

7. Testi on mieluiten tehtävä lämpötilassa 20 ± 0,5 ° C. Valittua lämpötilaa on pidettävä yllä laitteen kaikissa tärkeissä osissa.

Alustava testi

8. Noin 0,1 g näytettä (kiinteät aineet on ensin jauhettava) pannaan lasilla suljettuun, 10 ml:n asteikolla varustettuun mittasylinteriin, johon lisätään asteittain suurenevia määriä huoneenlämpöistä vettä. Jokaisen vedenlisäyksen jälkeen seosta ravistetaan 10 minuuttia ja tarkistetaan silmämääräisesti, ettei liuokseen ole jäänyt liukenemattomia hiukkasia. Jos näyte tai sen osa jää liukenematta 10 ml:n vedenlisäyksen jälkeen, koetta on jatkettava 100 ml:n mittasylinterissä. Likimääräinen liukoisuus ilmenee jäljempänä olevasta

▼M4

taulukosta 1 sen vesimäärän alta, jonka lisäyksen jälkeen näyte on täysin liuennut. Jos liukoisuus on huono, testiaineen liukeneminen voi kestää kauan, ja sitä varten on odotettava vähintään 24 tuntia. Jos testiaine ei ole liuennut 24 tunnin kuluttua, on odotettava kauemmin (enintään 96 tuntia), tai liuosta on yritettävä laimentaa, jotta voitaisiin päättää, käytetäänkö kolonnieluutio- vai pullomenetelmää.

Taulukko 1

0,1 liukenee X ml:aan vettä	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Likimääräinen liukoisuus	< 1 000	1 000–2-00	200–100	100–50	50–10	10–1	< 1

Kolonnieluutiomenetelmä

Periaate

9. Tämä menetelmä perustuu veden avulla suoritettavaan näytteen eluutioon mikrokolonnista, jossa on inerttiä, runsaalla määrällä näytettä päällystettyä kantaja-ainetta, esimerkiksi lasihelmiä tai hiekkaa (2). Vesiliukoisuus ilmoitetaan eluaatin massapitoisuutena, kun se on saavuttanut tasanteen ajan funktiona.

Laite

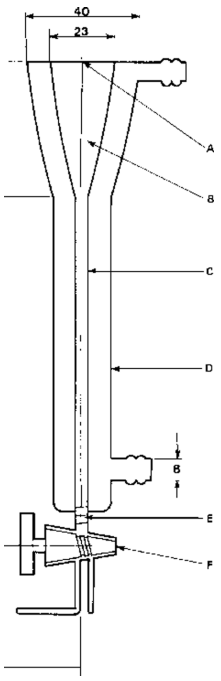
10. Laite koostuu mikrokolonnista (kuva 1), jonka lämpötila pidetään vakiona. Se kytketään joko kiertopumppuun (kuva 2) tai tasausastiaan (kuva 3). Mikrokolonnin sisällä on inerttiä kantaja-ainetta. Sitä pitää paikallaan pieni lasivillatulppa, joka myös suodattaa hiukkasia. Mahdollisia kantaja-aineeksi sopivia materiaaleja ovat lasihelmet, piimaa tai muut inertit materiaalit.

11. Kuvassa 1 oleva mikrokolonni sopii käytettäväksi kiertopumpun kanssa. Sen ylätilaan mahtuu viisi tilavuutta vettä (jotka poistetaan kokeen alussa) ja viisi näytettä (joita analysoidaan kokeen aikana). Vaihtoehtoisesti kokoa voidaan pienentää, jos järjestelmään voidaan lisätä vettä kokeen aikana ensimmäisten viiden epäpuhtauksien poistoon tarkoitetun tilavuuden korvaamiseksi. Kolonni liitetään inertistä materiaalista valmistetulla putkella kiertopumppuun, joka pystyy säätämään virtauksia, joiden nopeus on noin 25 ml/h. Kiertopumppu voi olla esimerkiksi peristaltiikkapumppu tai kalvopumppu. On huolehdittava siitä, ettei putken materiaali aiheuta saastumista ja/tai adsorptiota.

12. Kuvassa 3 on kaaviokuva tasausastian käyttämisestä. Tässä mallissa mikrokolonniin on laitettu yksitiesulkuventtiili. Liitos tasausastiaan toteutetaan lasihioksella ja inertistä materiaalista valmistetulla putkella. Virtausnopeuden tasausastiasta on oltava noin 25 ml tunnissa.

▼**M4**

Kuva 1



Mitat millimetreinä

A. Lasihioksen liitäntä

B. Ylätila

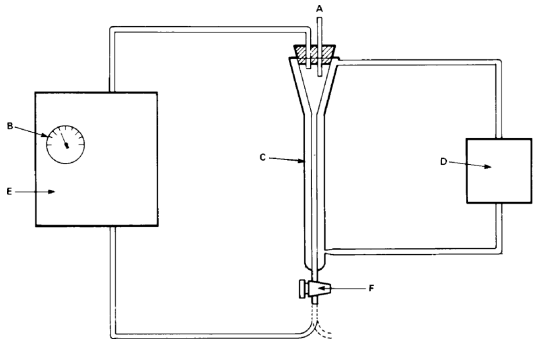
C. Sisätila 5

D. Ulkotila 19

E. Lasivillatulppa

F. Sulkuventtiili

Kuva 2



A. Paineen tasaus

B. Virtausmittari

C. Mikrokolonni

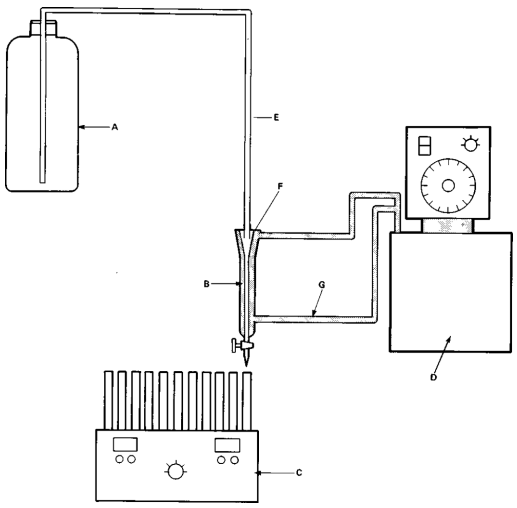
D. Termostaatilla varustettu kiertopumppu

E. Kiertopumppu

F. Kaksitieventtiili näytteenottoa varten

▼**M4**

Kuva 3



A. Tasausastia (esimerkiksi 2,5 litran pullo)

B. Kolonni

C. Fraktionkeräin

D. Termostaatti

E. Teflonputki

F. Lasihios

G. Vesilinja (termostaatin ja kolonnin välillä, sisähalkaisija noin 8 mm)

13. Noin 600 mg kantaja-ainetta siirretään 50 ml:n pyörökolviin. Sopiva määrä testiainetta liuotetaan haihtuvaan liuottimeen, joka on laadultaan analyyttisen puhdasta reagenssia, ja kantaja-aine täytetään sopivalla määrällä tätä liuosta. Liuottimen on haihduttava täysin, esimerkiksi pyörivässä haihduttimessa, sillä muutoin kantaja-aine ei kyllästy vedellä eluutiovaiheen aikana kantaja-aineen pinnan jakaantumisen vuoksi. Täytön jälkeen kantaja-ainetta pidetään noin 5 ml:ssä vettä noin kahden tunnin ajan, minkä jälkeen suspensio kaadetaan mikrokolonniin. Vaihtoehtoisesti voidaan kaataa kuivaa, täytettyä kantaja-ainetta vedellä täytettyyn mikrokolonniin ja jättää se tasapainottumaan kahden tunnin ajaksi.

14. Kantaja-aineen täyttö saattaa aiheuttaa ongelmia, mikä johtaa virheellisiin tuloksiin, esimerkiksi jos testiaine lisätään öljynä. Nämä ongelmat on tutkittava ja yksityiskohdat on raportoitava.

Mittauksen tekeminen kiertopumpun avulla

15. Käynnistetään virtaus kolonnin läpi. Suositeltava virtausnopeus on noin 25 ml/h, mikä vastaa 10:tä tilavuutta tunnissa kuvatun kolonnin kohdalla. Vesiliukoiset epäpuhtaudet poistetaan hylkäämällä vähintään ensimmäiset viisi tilavuutta. Tämän jälkeen kiertopumppu saa käydä, kunnes tasapaino on saavutettu. Se voidaan todeta saavutetuksi, kun viiden peräkkäin otetun näytteen pitoisuudet vaihtelevat enintään ± 30 prosenttia satunnaisella tavalla. Näytteenottovälin on vastattava vähintään eluentin kymmenen tilavuuden läpivirtausta. Sen mukaan, mitä analyysimenetelmää käytetään, voi olla tarpeen määrittää pitoisuus-aikakäyrä sen osoittamiseksi, että tasapaino on saavutettu.

▼M4

Mittauksen tekeminen tasausastian avulla

16. Peräkkäiset eluaattifraktiot kerätään ja analysoidaan valitun menetelmän mukaisesti. Vesiliukoisuuden määritykseen käytetään vähintään viisi peräkkäin otettua fraktiota eluaatin keskialueelta, jossa pitoisuudet pysyvät vakiona (± 30 %).

17. Ensisijainen eluentti on kaksoistislattu vesi. Myös deionisoitua vettä, jonka resistiivisyys on yli 10 megaohmia/cm ja jonka orgaaninen kokonaishiilipitoisuus on alle 0,01 prosenttia, voidaan käyttää.

18. Kummankin menetelmän yhteydessä on tehtävä toinen ajo, jossa virtausnopeus on puolet ensimmäisen ajon virtausnopeudesta. Jos molempien ajojen tulokset ovat yhtenevät, testin katsotaan olevan tyydyttävä. Jos mitattu liukoisuus on suurempi alemman virtausnopeuden yhteydessä, virtausnopeuden puolittamista on jatkettava, kunnes saadaan kaksi peräkkäistä, saman liukoisuuden antavaa ajoa.

19. Kummankin menetelmän yhteydessä fraktioista on etsittävä kolloideja Tyndall-ilmiön avulla. Hiukkasten esiintyminen mitätöi testin, ja testi on toistettava sen jälkeen, kun kolonnin suodatustehoa on ensin parannettu.

20. Jokaisen näytteen pH on mitattava ensisijaisesti erikoistestiliuskoja käyttämällä.

Pullomenetelmä

Periaate

21. Testiaine (kiinteät aineet on jauhettava) liuotetaan veteen lämpötilassa, joka on hieman testilämpötilan yläpuolella. Kun kyllästyminen saavutetaan, seos jäähdytetään, ja sitä pidetään sen jälkeen testilämpötilassa. Vaihtoehtoisesti mittaus voidaan suorittaa suoraan testilämpötilassa edellyttäen, että kyllästymistasapaino varmistetaan soveltuvalla näytteenotolla. Tämän jälkeen määritetään testiaineen massapitoisuus sopivalla analyysimenetelmällä vesiliuoksessa, joka ei saa sisältää liukenemattomia hiukkasia (3).

Laite

22. Pullomenetelmää varten tarvitaan seuraavat osat:

— tavallisia laboratoriolaseja ja -instrumentteja

— laite, jolla liuoksia voidaan ravistaa säädetyissä vakiolämpötiloissa

— sentrifugi (mieluiten termostaatilla varustettu), jos sellainen tarvitaan emulsioiden käsittelyyn

— analyysilaitteet.

Mittauksen tekeminen

23. Alustavan testin avulla saadaan tieto halutun vesimäärän kyllästämiseen tarvittavasta ainemäärästä. Noin viisinkertainen määrä ainetta punnitaan kolmeen eri lasitulpalla varustettuun lasiastiaan (esimerkiksi sentrifugiputkiin tai pulloihin). Kuhunkin astiaan laitetaan analyysimenetelmän ja liukoisuusalueen mukaan valittu vesimäärä. Astiat suljetaan tiiviisti, ja niitä ravistetaan 30 °C:ssa. Tarkoitukseen käytetään ravistus- tai sekoitustapaa, jossa voidaan ylläpitää vakiolämpötilaa, esimerkiksi magneettisekoitusta termostaatilla varustetussa vesihauteessa). Vuorokauden kuluttua yksi astioista tasapainotetaan 24 tunnin aikana testilämpötilassa astiaa ajoittain ravistamalla.

▼M4

Astian sisältö lingotaan testilämpötilassa, ja testiaineen pitoisuus määritetään kirkkaasta vesifaasista sopivan analyyttisen menetelmän mukaisesti. Toista jäljellä olevaa astiaa käsitellään ensimmäisen 30 °C:ssa tapahtuneen tasapainotuksen jälkeen samalla tavoin kaksi vuorokautta ja toista astiaa kolme vuorokautta. Jos vähintään kahdesta viimeksi käsitellystä astiasta mitatut pitoisuudet vaihtelevat enintään 15 prosenttia, testi hyväksytään. Jos astioista 1, 2 ja 3 saadut tulokset osoittavat nousevaa suuntausta, koko testi on toistettava pidempiä tasapainotusaikoja käyttäen.

24. Testi voidaan myös toteuttaa ilman 30 °C:ssa tapahtuvaa esi-inkubaatiota. Kyllästystasapainon saavuttamisnopeutta voidaan arvioida jatkamalla näytteidenottoa, kunnes sekoitusaika ei enää vaikuta mitattuihin pitoisuuksiin.

25. Jokaisen näytteen pH on mitattava ensisijaisesti erikoistestiliuskoja käyttämällä.

Analyyttiset määritykset

26. Näitä määrityksiä varten suositellaan ainekohtaista menetelmää, koska pienet määrät liukoisia epäpuhtauksia voivat aiheuttaa suuria virheitä mitatussa liukoisuudessa. Esimerkkejä tällaisista menetelmistä ovat kaasu- tai nestekromatografia, titraus, fotometriset menetelmät ja kulometriset menetelmät.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

Kolonnieluutiomenetelmä

27. Jokaista ajoa kohti on laskettava vähintään viiden peräkkäisen kyllästysalueelta otetun näytteen keskiarvo ja näytteiden keskihajonta. Kahdesta eri virtauksilla toteutetusta testistä saatujen keskiarvojen ero saa olla enintään 30 prosenttia.

Pullomenetelmä

28. Kaikkien kolmen pullon yksittäisistä tuloksista, joiden välinen ero saa olla enintään 15 prosenttia, lasketaan keskiarvo.

Testiraportti

Kolonnieluutiomenetelmä

29. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

— alustavan testin tulokset

— kemiallinen identiteetti ja epäpuhtaudet (esipuhdistusvaihe, jos tarpeen)

— jokaisen näytteen pitoisuus, virtausnopeus ja pH

— jokaisen ajon vähintään viiden kyllästysalueelta otetun näytteen keskiarvot ja keskihajonnat

— kahden peräkkäisen ajon keskiarvo

— veden lämpötila kyllästysprosessin aikana

— analyysimenetelmä

— käytetyn kantaja-aineen luonne

— kantaja-aineen täyttö

— käytetty liuotin

— todisteet aineen mahdollisesta kemiallisesta epästabiliteetista testin aikana

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

▼**M4**

Pullomenetelmä

30. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

— alustavan testin tulokset

— kemiallinen identiteetti ja epäpuhtaudet (esipuhdistusvaihe, jos tarpeen)

— yksittäiset analyyttiset määritykset sekä keskiarvo, jos jokaista pulloa kohti on määritetty useampia arvoja

— jokaisen näytteen pH

— keskiarvo niistä eri astioista, joiden tulokset olivat yhteneviä

— testilämpötila

— analyyttinen menetelmä

— todisteet aineen mahdollisesta kemiallisesta epästabiliteetista testin aikana

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Komission direktiivi 92/69/ETY, annettu 31 päivänä heinäkuuta 1992, vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen seitsemännentoista kerran, EYVL L 383, 29.12.1992, s. 113.

2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use -Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.

3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

▼B

A.8 **JAKAANTUMISKERROIN**

1. **MENETELMÄ**

Tässä kuvattu ravistuspullomenetelmä perustuu OECD:n testiohjeeseen (1).

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa selvittää ensin tutkittavan aineen rakennekaava, dissosiaatiovakio, vesiliukoisuus, hydrolysoituminen, n-oktanoliliukoisuus ja pintajännitys.

Mitattaessa ionisoituvia aineita on aina käytettävä aineiden ionisoitumatonta muotoa (vapaata happoa tai vapaata emästä), joka on saatu sellaisen sopivan puskurin avulla, jonka pH on vähintään yhden pH-yksikön pK-arvoa pienempi (vapaa happo) tai suurempi (vapaa emäs).

Testi voidaan tehdä kahdella eri menetelmällä: ravistuspullomenetelmällä tai HPLC-nestekromatografialla. Ensimmäistä menetelmää voidaan soveltaa, kun P_{ow}-arvo (katso jäljempänä olevaa määritelmää) on - 2...4, ja toista menetelmää arvon ollessa 0...6. Alustavan kokeen avulla saadaan arvio näytteen jakaantumiskertoimesta, minkä jälkeen valitaan sopiva menetelmä.

Ravistuspullomenetelmää voidaan soveltaa vain huomattavan puhtaiden, vesi- ja n-oktanoliliukoisten aineiden testaukseen. Menetelmää ei voida soveltaa pinta-aktiivisten aineiden testaukseen (näiden kohdalla on esitettävä laskettu arvo tai arvio, joka perustuu yksittäisiin vesi- ja n-oktanoliliukoisuuksiin).

HPLC-menetelmää ei voida soveltaa vahvojen happojen ja emästen, metallikompleksien, pinta-aktiivisten aineiden tai eluentin kanssa reagoivien aineiden testaukseen. Näiden aineiden kohdalla on esitettävä laskettu arvo tai arvio, joka perustuu yksittäisiin vesi- ja n-oktanoliliukoisuuksiin.

HPLC-menetelmä ei ole yhtä herkkä näytteessä oleville epäpuhtauksille kuin ravistuspullomenetelmä. Kuitenkin epäpuhtaudet voivat joissakin tapauksissa vaikeuttaa tulosten tulkintaa, koska kärkien kohdentaminen on tällöin epävarmaa. Jos seoksen testauksessa saadaan määrittämätön kaista, on ilmoitettava log P:n ylä- ja alaraja.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan jakaantumiskerroin (P) on liuotetun aineen tasapainopitoisuuksien (c_i) välinen suhde kaksifaasijärjestelmässä, jossa on kaksi toisiinsa heikosti sekoittuvaa liuotinta:

$$p_{ow} = \frac{C_{n-oktanoli}}{C_{vesi}}$$

Jakaantumiskerroin (P) on siis kahden pitoisuuden välinen suhde, ja se ilmoitetaan normaalisti kymmenkantaisena logaritmina (log P).

▼B

1.3 VERTAILUAINEET

Ravistuspullomenetelmä

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

HPLC-menetelmä

Aineen HPLC-mittaustulosten ja yhdisteen P-arvon välinen vastaavuus saadaan kalibrointikäyrästä, jossa log P esitetään kromatografisten tietojen funktiona. Kalibrointikäyrän kromatografisten tietojen on katettava vähintään 6 vertailupistettä. Käyttäjä valitsee sopivat vertailuaineet. Mahdollisuuksien mukaan on valittava vähintään yksi vertailuaine, jonka P_{ow}-arvo on pienempi kuin näytteen P_{ow}-arvo, ja yksi vertailuaine, jonka P_{ow}-arvo on suurempi. Kun log P -arvo on pienempi kuin 4, kalibrointi voi perustua ravistuspullomenetelmällä saatuihin tuloksiin. Kun log P -arvo on suurempi kuin 4, kalibrointi voi perustua validoituihin, lähdekirjallisuudesta saatuihin arvoihin, jotka ovat yhteneviä laskettujen arvojen kanssa. Tarkkuutta voidaan parantaa käyttämällä vertailuaineita, joiden rakenne muistuttaa näytteen rakennetta.

Lähdekirjallisuudessa on laajat luettelot monen kemikaaliryhmän log P_{ow} -arvoista (2), (3). Jos näytteen kanssa samankaltaisen rakenteen omaavien yhdisteiden tietoja ei ole käytettävissä, voidaan käyttää yleisempää kalibrointia, joka perustuu muihin vertailuaineisiin.

Liitteessä 2 on luettelo suositeltavista vertailuaineista ja niiden P_{ow}-arvoista.

1.4 MENETELMIEN PERIAATTEET

1.4.1 **Ravistuspullomenetelmä**

Jakaantumiskertoimen määritystä varten järjestelmän kaikkien keskinäisessä vuorovaikutuksessa olevien osien on saavutettava tasapaino, minkä jälkeen määritetään järjestelmän kahteen faasiin liuotetun aineen pitoisuudet. Lähdekirjallisuudessa esitetään useita tekniikoita, joiden avulla molemmat faasit voidaan sekoittaa huolella ja joiden avulla niistä voidaan määrittää näytteen tasapainopitoisuudet kummassakin faasissa faasien erotuksen jälkeen.

1.4.2 **HPLC-menetelmä**

HPLC tapahtuu analyyttisessa kolonnissa, joka on täytetty kaupallisesti saatavana olevalla, pitkiä hiilivetyketjuja (esimerkiksi C_8, C_{18}) sisältävällä kiinteällä faasilla, joka on kemiallisesti sidottu piidioksidiin. Kolonniin ruiskutetut kemikaalit liikkuvat eri nopeuksilla sen mukaan, mikä on niiden jakaantumiskerroin liikkuvan faasin ja kiinteän hiilivetyfaasin välillä. Kemikaaliseokset eluoituvat hydrofobisuuden perusteella siten, että vesiliukoiset kemikaalit eluoituvat ensin ja öljyliukoiset viimeisenä suhteessa niiden hiilivety-vesi-jakaantumiskertoimeen. Näin voidaan määrittää vastafaasikolonnin retention ja n-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen välinen suhde. Jakaantumiskerroin voidaan laskea *käyttökertoimen* k perusteella seuraavasti:

▼B

$$k = \frac{t_R - t_o}{t_o}$$

jossa t_R = näytteen retentio ja t_0 = liuotinmolekyylin keskimääräinen läpäisyaika (viive).

Kvantitatiivisia analyyttisia menetelmiä ei tarvita. Eluointiaikojen määritys riittää.

1.5 LAATUKRITEERIT

1.5.1 **Toistettavuus**

Ravistuspullomenetelmä

Jakaantumiskertoimen tarkkuus varmistetaan tekemällä kolme määritystä eri testiolosuhteissa, joissa näytteen määrä ja liuotintilavuuksien suhde voivat vaihdella. Saadut jakaantumiskertoimen arvot saavat vaihdella enintään ± 0,3 logaritmiyksikköä kymmenkantaisina logaritmeina ilmaistuna.

HPLC-menetelmä

Mittaustulokset varmistetaan tekemällä kaksi määritystä. Yksittäisten mittausten perusteella saadut log P -arvot saavat vaihdella enintään ± 0,1 logaritmiyksikköä.

1.5.2 **Herkkyys**

Ravistuspullomenetelmä

Menetelmän mittausalue määräytyy analyyttisen menetelmän havaintorajojen mukaan. Yleensä log P_{ow} -arvoja voidaan määrittää alueella - 2...4 (määrätyissä olosuhteissa jopa arvoon log P_{ow} = 5 asti), kun liuenneen aineen pitoisuus kummassakin faasissa on enintään 0,01 moolia litrassa.

HPLC-menetelmä

HPCL-menetelmällä voidaan laskea jakaantumiskerroin P_{ow}-alueella 0–6.

Yleensä yhdisteen jakaantumiskertoimeksi voidaan arvioida ± 1 logaritmista yksikköä ravistuspullomenetelmän arvosta. Tyypillisiä korrelaatioita löytyy lähdekirjallisuudesta (4), (5), (6), (7), (8). Yleensä on mahdollista saada tarkempia tuloksia, kun korrelaatiopisteet on saatu rakenteellisesti samankaltaisten vertailuyhdisteiden tiedoista (9).

▼B

1.5.3 **Spesifisyys**

Ravistuspullomenetelmä

Nernstin jakaantumislakia voidaan laimennettujen liuosten kohdalla soveltaa vain vakiolämpötilassa, vakiopaineessa ja vakio-pH:ssa. Suoraan sovellettuna laki koskee vain puhtaita aineita, jotka jakautuvat kahden puhtaan liuottimen välillä. Jos toisessa tai molemmissa faaseissa on samanaikaisesti useita erilaisia liuoksia, tämä saattaa vaikuttaa tuloksiin.

Liuotettujen molekyylien assosiaatiosta tai dissosiaatiosta seuraa poikkeamia Nernstin jakaantumislaista. Tällaiset poikkeamat voidaan osoittaa sillä, että jakaantumiskerroin vaihtelee liuoksen pitoisuuden mukaan.

Koska tasapainoja on useita, testimenetelmää ei pidä soveltaa ionisoituviin yhdisteisiin ilman korjausta. Tällaisten yhdisteiden kohdalla on harkittava veden korvaamista puskuriliuoksilla, ja puskurin pH:n tulisi poiketa vähintään yhden pH-yksikön verran aineen pKa-arvosta. Lisäksi on otettava huomioon valitun pH:n sovellettavuus kyseiseen ympäristöön.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Jakaantumiskertoimen alustava arviointi**

Alustavaan arviointiin tulisi mieluiten käyttää laskentamenetelmää (katso liitettä 1). Määrätyissä tapauksissa arviointiin voidaan käyttää myös näytteen liukoisuutta puhtaisiin liuottimiin (10).

1.6.2 **Ravistuspullomenetelmä**

1.6.2.1 *Valmistelutoimet*

n-oktanoli: Jakaantumiskertoimen määritykseen käytetään analyyttisen puhdasta reagenssia.

Vesi: Tarkoitukseen käytetään lasi- tai kvartsilaitteessa tislattua tai kaksoistislattua vettä. Ionisoituvien aineiden kohdalla on tarpeen mukaan käytettävä puskuriliuoksia veden sijasta.

Huomautus:

Suoraan ioninvaihtimesta otettua vettä ei pidä käyttää.

1.6.2.1.1 Liuottimien esikyllästys

Ennen jakaantumiskertoimen määritystä molemmat liuotinjärjestelmän faasit kyllästetään ravistamalla testilämpötilassa. Käytännöllinen toteutustapa on käyttää kahta suurta, analyyttisen puhtaalla n-oktanolilla tai vedellä täytettyä varastopulloa, joissa on tarpeellinen määrä toista liuotinta, pitää pulloja vuorokauden ajan mekaanisessa ravistimessa ja antaa tämän jälkeen pullojen levätä, kunnes faasit erottuvat ja kyllästyspiste saavutetaan.

▼B

1.6.2.1.2 Testin valmistelutoimet

Kaksifaasijärjestelmän on täytettävä testausastia lähes kokonaan. Näin voidaan pienentää haihtumisesta aiheutuvaa ainehukkaa. Aineen tilavuussuhde ja määrät määräytyvät seuraavien tekijöiden mukaan:

— jakaantumiskertoimen alustava määritys (katso edellä),

— pienin määrä näytettä, joka tarvitaan analyyttistä menetelmää varten,

— rajoitus, jonka mukaan pitoisuus ei saa ylittää 0,01 moolia litrassa kummassakaan faasissa.

Tehdään kolme testiä. Ensimmäisessä käytetään laskettua n-oktanolin ja veden tilavuussuhdetta, toisessa suhde puolitetaan ja kolmannessa se kerrotaan kahdella (esimerkiksi 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3 Näyte

Valmistetaan varastoliuos esikyllästämällä n-oktanolia vedellä. Varastoliuoksen pitoisuus määritetään tarkasti juuri ennen liuoksen käyttöä jakaantumiskertoimen määritykseen. Liuosta on pidettävä olosuhteissa, joissa sen stabiliteetti voidaan taata.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

Lämpötila on pidettävä vakiona (± 1 °C) alueella 20–25 °C.

1.6.2.3 *Mittauksen suorittaminen*

1.6.2.3.1 Jakaantumistasapainon luominen

Jokaista testiolosuhdetta varten valmistetaan kaksi testausastiaa, joissa on tarkasti mitatut määrät kumpaakin liuotinta ja tarpeellinen määrä varastoliuosta.

Mitataan n-oktanolifaasit tilavuuden mukaan. Testausastiat pannaan sopivaan ravistuslaitteeseen tai niitä ravistetaan käsin. Jos käytössä on sentrifugiputki, suositellaan sen kääntämistä nopeasti poikittaisakselillaan 180 astetta, jolloin mahdollisesti loukkuun jäänyt ilma nousee molempien faasien läpi. Käytäntö on osoittanut, että 50 tällaisella käännöllä voidaan saavuttaa jakaantumistasapaino. Varmuuden vuoksi suositellaan kuitenkin 100:aa kääntöä viidessä minuutissa.

1.6.2.3.2 Faasierotus

Tarvittaessa faasien erotukseen on käytettävä sentrifugointia. Tämä tehdään laboratoriosentrifugissa huoneenlämmössä. Jos sentrifugissa ei ole termostaattia, sentrifugiputket on pidettävä testilämpötilassa vähintään yhden tunnin ajan ennen analyysia.

▼B

1.6.2.4 *Analyysi*

Jakaantumiskertoimen määritystä varten on määritettävä näytteen pitoisuus kummassakin faasissa. Tämä voidaan toteuttaa ottamalla alikvootti kumpaakin faasia kummastakin putkesta testiolosuhdetta kohti ja analysoimalla otokset valitulla menetelmällä. Aineen kokonaismäärä kummassakin faasissa lasketaan ja arvoja verrataan alun perin lisättyyn määrään.

Näytteenotto vesifaasista on tehtävä menetelmällä, joka minimoi n-oktanolin mukaanpääsyn riskin. Poistettavalla neulalla varustettu lasiruisku on hyvä vaihtoehto. Näytteenottoa varten ruisku täytetään osittain ilmalla, joka työnnetään varovasti ulos vietäessä ruisku n-oktanolikerroksen läpi. Tämän jälkeen ruiskuun vedetään sopiva määrä vesifaasia. Ruisku poistetaan nopeasti liuoksesta ja neula irrotetaan. Ruiskun sisältöä voidaan tämän jälkeen käyttää vesinäytteenä. Aineen pitoisuus kummassakin erotetussa faasissa määritetään mieluiten ainekohtaisella menetelmällä. Sopivia analyyttisiä menetelmiä ovat esimerkiksi

— fotometriset menetelmät,

— kaasukromatografia,

— nestekromatografia (HPLC).

1.6.3 **HPLC-menetelmä**

1.6.3.1 *Valmistelutoimet*

Laite

Menetelmää varten tarvitaan sykkimättömällä pumpulla ja sopivalla ilmaisulaitteella varustettu nestekromatografi, jossa tulisi olla suihkusilmukoilla varustettu suihkuventtiili. Kiinteässä faasissa olevat polaariset ryhmät saattavat vakavasti häiritä HPCL-kolonnin tehokkuutta, minkä vuoksi polaaristen ryhmien määrä kiinteissä faaseissa (1) on minimoitava. Menetelmässä voidaan käyttää kaupallisesti saatavana olevia mikrohiukkas-vastafaasipakkauksia tai valmiiksi pakattuja kolonneja. Ruiskutusjärjestelmän ja analyyttisen kolonnin välissä voidaan pitää suojakolonnia.

Liikkuva faasi

Eluutioliuotin valmistetaan HPLC-laatuisesta metanolista ja HPLC-laatuisesta vedestä. Liuottimelle tehdään kaasunpoisto ennen käyttöä. On käytettävä isokraattista eluutiota. Metanoli-vesiseoksessa on oltava vähintään 25 % vettä. Yleensä seos, jossa on metanolia ja vettä tilavuussuhteessa 3:1, on tyydyttävä log P 6 -yhdisteiden eluoimiseksi yhdessä tunnissa, kun virtausnopeus on 1 ml/min. Jos yhdisteiden log P -arvo on suuri, saattaa olla tarpeen lyhentää eluointiaikaa (myös vertailuaineiden kohdalla) vähentämällä liikkuvan faasin polaarisuutta tai kolonnin pituutta.

Aineilla, jotka liukenevat n-oktanoliin hyvin heikosti, on yleensä poikkeavan alhainen HPLC-menetelmällä saatu log P_{ow} -arvo. Joskus tällaisten yhdisteiden tuottamat kärjet eivät ylitä liuottimen tasoa. Syynä on todennäköisesti se, että jakaantumisprosessi on liian hidas, eikä tasapaino ehdi asettua HPLC-erotteluun normaalisti käytetyssä ajassa. Tulosten luotettavuutta voidaan yleensä parantaa pienentämällä virtausnopeutta tai metanolin ja veden välistä suhdetta.

▼B

Näytteiden ja vertailuaineiden liukoisuuden liikkuvaan faasiin on oltava tarpeeksi suuri niiden havaitsemista varten. Vain poikkeustapauksissa voidaan käyttää lisäaineita metanoli-vesiseoksen yhteydessä, koska lisäaineet muuttavat kolonnin ominaisuuksia. Jos käytetään lisäaineita kromatogrammin tuottamiseen, on ehdottomasti käytettävä erillistä, samantyyppistä kolonnia. Jos metanoli-vesiseos ei sovellu tarkoitukseen, voidaan käyttää muita orgaanisen liuottimen ja veden seoksia, esimerkiksi etanoli-vesi- tai asetonitriili-vesiseosta.

Ionisoivien yhdisteiden osalta eluentin pH on kriittinen. Sen on oltava kolonnin pH-alueella, yleensä 2-8. Puskurointia suositellaan. On varottava suolan saostumista ja kolonnin huononemista, mitä voi tapahtua eräiden orgaanisten faasi-puskuriseosten yhteydessä. HPLC-mittauksia, joissa piidioksidipohjaisen kiinteän faasin pH on yli 8, ei suositella, koska emäksinen liikkuva faasi voi aiheuttaa kolonnin suorituskyvyn nopeaa huononemista.

Liuokset

Vertailuaineiden on oltava mahdollisimman puhtaita. Testi- ja kalibrointitarkoituksiin käytettävät yhdisteet liuotetaan liikkuvaan faasiin mahdollisuuksien mukaan.

Testiolosuhteet

Mittausten aikana lämpötila saa vaihdella enintään ± 2 K.

1.6.3.2 ***Mittaukset***

Viiveen t_o laskeminen

Viive t_o voidaan määrittää käyttämällä homologista sarjaa (esimerkiksi n-alkyylimetyyliketoneja) tai kolonnin läpi pidättymättä kulkevia orgaanisia yhdisteitä (esimerkiksi tiokarbamidia tai formamidia). Ensimmäistä vaihtoehtoa käytettäessä kolonniin ruiskutetaan vähintään seitsenosainen homologinen sarja ja vastaavat retentiot määritetään. Suoraan saadut retentiot $t_{r(nc+1)}$ piirretään ajan $t_{r(nc)}$ funktiona, ja regressioyhtälön

$$t_{r(nc+1)} = a + b\backslash;\ t_{r(nc)}$$

poikkeama ja kaltevuus b määritetään (n_c = hiiliatomien määrä). Viive t_o saadaan tämän jälkeen seuraavasta yhtälöstä:

$$t_o = a/(1 - b)$$

▼B

Kalibrointikäyrä

Seuraavaksi laaditaan korrelaatiokäyrä, joka esittää soveltuvien vertailuaineiden log k -arvot log P -arvojen funktiona. Tätä varten ruiskutetaan samanaikaisesti sarja, jossa on 5–10 vakiovertailuainetta, joiden log P kattaa odotetun alueen. Retentiot on suositeltavaa määrittää ilmaisinjärjestelmään kytketyllä tallentavalla integraattorilla. Käyttökertoimen k vastaavat logaritmit lasketaan ja merkitään käyrään ravistuspullomenetelmällä saatujen log P -arvojen funktiona. Kalibrointi tehdään määrätyin välein, vähintään kerran päivässä, jotta kolonnin suorituskyvyn mahdolliset muutokset voidaan havaita.

Näytteen käyttökertoimen määritys

Näytettä ruiskutetaan mahdollisimman pieneen määrään liikkuvaa faasia. Retentio määritetään kaksi kertaa. Tuloksen perusteella voidaan laskea käyttökerroin k. Näytteen jakaantumiskerroin voidaan interpoloida vertailuaineiden korrelaatiokäyrästä. Jos jakaantumiskerroin on hyvin pieni tai hyvin suuri, on käytettävä ekstrapolointia. Tällöin on erityisesti otettava huomioon regressiosuoran luottamusrajat.

2. **TIEDOT**

Ravistuspullomenetelmä

Määritettyjen log P -arvojen luotettavuus voidaan tarkistaa vertaamalla kaksoismääritysten keskiarvoa kokonaiskeskiarvoon.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet),

— jos menetelmiä ei voida soveltaa (esimerkiksi aineen pinta-aktiivisuuden vuoksi), laskettu arvo tai arvio, joka perustuu yksittäisiin n-oktanoli- tai vesiliukoisuuksiin,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

Ravistuspullomenetelmän osalta:

— alustavan arvioinnin tulos (jos sellainen on tehty),

— määrityslämpötila,

— tiedot pitoisuuden määritykseen käytetyistä analyyttisista menetelmistä,

— sentrifugointiaika ja -nopeus (jos sentrifugointia on käytetty),

▼B

— kummastakin faasista mitatut pitoisuudet (eli raportoidaan yhteensä 12 pitoisuutta) jokaista määritystä kohti,

— näytteen paino, yksittäisten testausastioiden faasien tilavuudet ja näytteen laskettu kokonaismäärä jokaisessa faasissa tasapainon saavuttamisen jälkeen,

— jakaantumiskertoimen (P) lasketut arvot, keskiarvo ja kaikkien määritysten keskiarvo jokaista testiolosuhdetta kohti. Jos on havaittu merkkejä jakaantumiskertoimen vaihtelusta pitoisuuden mukaan, tästä on oltava maininta raportissa,

— yksittäisten P-arvojen keskihajonta keskiarvon suhteen,

— kaikkien määritysten P-keskiarvo ilmoitetaan kymmenkantaisena logaritmilukuna,

— laskettu teoreettinen P_{ow} kun tällainen on määritetty tai kun mittausten perusteella saatu arvo on $> 10^4$,

— käytetyn veden ja vesifaasin pH,

— jos on käytetty puskureita veden sijasta, on ilmoitettava syy, puskureiden kokoonpano, pitoisuus ja pH sekä vesifaasin pH ennen testiä ja sen jälkeen.

HPLC-menetelmän osalta:

— alustavan arvioinnin tulos (jos sellainen on tehty),

— näytteet ja vertailuaineet sekä niiden puhtausaste,

— määritysten lämpötila-alue,

— pH, jossa määritykset on tehty,

— analyyttisen kolonnin, suojakolonnin, liikkuvan faasin ja ilmaisumenetelmän tiedot,

— retentiotiedot ja lähdekirjallisuudesta saadut, kalibroinnissa käytettyjen vertailuaineiden log P -arvot,

— regressiosuoran tiedot (log k:n riippuvuus log P:stä),

— retentiotietojen keskiarvo ja näytteen interpoloitu log P -arvo,

— laitteen ja käyttöolosuhteiden kuvaus,

— eluointiprofillit,

— kolonniin pantujen näytteiden ja vertailuaineiden määrät,

— viiveet ja niiden mittaustavat.

▼B

4. **VIITTEET**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) C. Hansch and A. J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A. J. Leo, dir.) — Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström and K. Dundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sei., 1981, vol. 12, 219 (1981).

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

(7) W. E. Hammers et al, J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

(8) J. E. Haky and A. M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.

(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223-339.

(11) R. F. Rekker and H. M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

(12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(13) R. F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for Industrial use — Determination of partition coefficient — Flask shaking method.

(15) C. V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev, 1971, vol. 71, 525.

(17) C. Hansch, A. Leo, S. H. Unger, K. H. Kim, D. Nikaitani and E. J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.

(18) W. B. Neely, D. R. Branson and G. E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.

(19) D. S. Brown and E. W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

(20) J. K. Seydel and K. J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.

▼B

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.

(22) Y. C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel, 1978.

(23) N. S. Nirrlees, S. J. Noulton, C. T. Murphy, P. J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B

Liite 1

Laskenta- ja arviointimenetelmät

JOHDANTO

Julkaisussa Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a) on yleinen johdatus aiheeseen (laskentamenetelmiä, tietoja ja esimerkkejä).

Laskettuja P_{ow}-arvoja voidaan käyttää seuraviin tarkoituksiin:

— päättäminen soveltuvasta kokeellisesta menetelmästä (ravistuspullomenetelmän alue: log P_{ow}: - 2...4, HPLC-menetelmän alue: log P_{ow}: 0...6),

— sopivien testiolosuhteiden (esimerkiksi HPLC-menetelmän vertailuaineiden ja ravistuspullomenetelmän n-oktanoli-vesisuhteen) valinta,

— laboratorion sisäiset tarkistukset menetelmävirheiden löytämiseksi,

— P_{ow}-arvion antaminen tapauksissa, joissa kokeellisia menetelmiä ei voida soveltaa teknisistä syistä.

ARVIOINTIMENETELMÄ

Jakaantumiskertoimen alustava arviointi

Jakaantumiskertoimen arvo voidaan arvioida näytteen liukoisuudesta puhtaisiin liuottimiin, joka voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$P_{arvio} = \frac{\text{kyllästys } c_{n-\text{oktanoli}}}{\text{kyllästys } c_{vesi}}$$

LASKENTAMENETELMÄT

Laskentamenetelmien periaate

Kaikki laskentamenetelmät perustuvat molekyylin muodolliseen fragmentointiin sopiviin alarakenteisiin, joille on tiedossa luotettavat log P_{ow} -differentiaalit. Koko molekyylin log P_{ow} -arvo voidaan tämän jälkeen laskea fragmenttiarvojensa summana lisättynä korjaustermeillä, jotka perustuvat molekyylin sisäisiin vuorovaikutuksiin.

Luettelot fragmenttivakioista ja korjaustermeistä ovat saatavana lähteistä (b), (c), (d) ja (e). Joitakin niistä päivitetään säännöllisesti.

Laatukriteerit

Yleisesti ottaen laskentamenetelmien luotettavuus heikkenee tutkittavan yhdisteen monimutkaisuuden kasvaessa. Kun tutkitaan yksinkertaisia molekyyleja, joilla on alhainen molekyylipaino ja yksi tai kaksi funktionaalista ryhmää, voidaan odottaa, että poikkeama fragmentaatiomenetelmien ja mitatun arvon välillä on 0,1 - 0,3 log P_{ow} -yksikköä. Kun käsitellään monimutkaisempia molekyyleja, virhemarginaali voi olla tätä suurempi. Tämä vaihtelee fragmenttivakioiden luotettavuuden ja saatavuuden mukaan sekä sen mukaan, miten hyvin molekyylin sisäiset vuorovaikutukset (esimerkiksi vetysidokset) ovat tunnistettavissa ja miten hyvin korjaustermejä osataan käyttää (ongelma pienenee käytettäessä tietokoneohjelmaa CLOGP-3) (b). Kun käsitellään ionisoivia yhdisteitä, on tärkeää, että lataus tai ionisointiaste otetaan huomioon oikealla tavalla.

▼B

Laskentamenetelmät

Hanschin π-menetelmä

Alkuperäinen hydrofobinen substituenttivakio, π, jonka ovat esittäneet Fujita et al. (f), määritetään seuraavasti:

$\pi_x = \log P_{ow}$ (PhX) - $\log P_{ow}$ (PhH)

jossa P_{ow} (PhX) on aromaattisen johdannaisen jakaantumiskerroin ja P_{ow} (PhH) on emoyhdisteen jakaantumiskerroin. Esimerkki:

($\pi_{Cl} = \log P_{ow}$ (C_6H_5Cl) - $\log P_{ow}$ (C_6H_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71.

Tämän määritelmän mukaan p-menetelmä soveltuu lähinnä aromaattiseen substituutioon, p-arvot suurelle määrälle substituentteja on yhdistetty taulukkomuotoon (b), (c), (d). Arvoja käytetään aromaattisten molekyylien tai alarakenteiden log P_{ow} -arvojen laskentaan.

Rekker-menetelmä

Rekkerin mukaan (g) log P_{ow} -arvo lasketaan seuraavasti:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{vuorovaikutustermit})$$

jossa f_l edustaa eri molekyylifragmenttivakioita ja a_l niiden esiintymistaajuutta tutkittavassa molekyylissa. Korjaustermit voidaan esittää yhden ainoan vakion C_m integraalikerrannaisina (niin sanottuna maagisena vakiona). Fragmenttivakiot f_l ja C_m on määritetty 1 054 kokeellista P_{ow}-arvoa (825 yhdistettä) sisältävän luettelon perusteella moninkertaista regressioanalyysiä (c), (h) käyttäen. Vuorovaikutustermin määritys tehdään lähdekirjallisuudessa kuvatun säännöstön mukaan (e), (h), (i).

Hansch-Leon menetelmä

Hanschin ja Leon mukaan (c) log P_{ow} lasketaan seuraavan suureyhtälön mukaan:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

jossa f_l edustaa eri molekyylifragmenttivakioita, F_j korjaustermejä ja a_i, b_j vastaavia esiintymistaajuuksia. Yrityksen ja erehdyksen kautta on koottu kokeellisista P_{ow}-arvoista johdettujen atomien ja ryhmien fragmenttiarvojen luettelo sekä korjaustermien F_j (niin sanottujen kertoimien) luettelo. Korjaustermit on jaettu useaan eri luokkaan (a), (c). Kaikkien näiden sääntöjen ja korjaustermien huomioonottaminen on melko monimutkaista ja hidasta. Tehtävää helpottavat markkinoilla myytävät erikoisohjelmat (b).

Yhdistetty menetelmä

Monimutkaisten molekyylien P_{ow}-laskentaa voidaan helpottaa huomattavasti jakamalla molekyylit suurehkoihin alarakenteisiin, joille on saatavana luotettavia P_{ow}-arvoja joko taulukoista (b), (c) tai omista mittauksista. Tällaiset fragmentit (esimerkiksi heterosykliset renkaat, antrakinoni ja atsobentseeni) voidaan sen jälkeen yhdistää Hanschin π-arvoihin tai Rekkerin tai Leon fragmenttivakioihin.

Huomautuksia

i) Laskentamenetelmiä voidaan soveltaa vain osittain tai kokonaan ionisoituihin yhdistelmiin, edellyttäen, että tarpeelliset korjauskertoimet voidaan ottaa huomioon.

▼B

ii) Jos voidaan olettaa, että molekyylin sisällä on vetysidoksia, on lisättävä vastaavat korjaustermit (noin + 0,6...+ 0,1 log P_{ow} -yksikköä). Indikaatiot vetysidosten olemassaolosta saadaan stereomalleista tai molekyylin spektroskooppisista tiedoista.

iii) Jos useat tautomeeriset muodot ovat mahdollisia, todennäköisintä muotoa käytetään laskennan perustana.

iv) Fragmenttivakioluetteloiden päivityksiä on seurattava huolella.

Raportti

Kun käytetään laskenta- tai arviointimenetelmiä, testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen kuvaus (seos, epäpuhtaudet jne.),

— indikaatiot mahdollisten vetysidosten olemassaolosta, dissosiaatiosta, latauksesta tai muista epätavallisista ilmiöistä (esimerkiksi tautomeria),

— laskentamenetelmän kuvaus,

— tietokannan nimi tai lähde,

— fragmenttivalinnan erikoispiirteitä,

— yksityiskohtainen selvitys laskennasta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(a) W. J. Lyman, W. F. Reehl and D. H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A. J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(e) R. F. Rekker, H. M. de Kort, Eur. J. Med. Chem.- Chim Ther, 1979, vol. 14, 479.

(f) T. Fujita, J. lwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175.

(g) R. F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.

(h) C. V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(i) R. A. Scherrer, ACS — American Chemical Society, Washington, D. C. 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

Liite 2

Suositeltavia vertailuaineita HPLC-menetelmää varten

Nro	Vertailuaine	log P_{ow}	pKa
1	2-butanoni	0,3	
2	4-asetyylipyridini	0,5	
3	Aniliini	0,9	
4	Asetanilidi	1,0	
5	Bentsyylialkoholi	1,1	
6	p-metoksifenoli	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoksietikkahappo	1,4	pKa = 3,12
8	Fenoli	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenoli	1,5	pKa = 3,96
10	Bentsonitriili	1,6	
11	Fenyyliasetonitriili	1,6	
12	4-metyylibentsyylialkoholi	1,6	
13	Asetofenoni	1,7	
14	2-nitrofenoli	1,8	pKa = 7,17
15	3-nitrobentsoehappo	1,8	pKa = 3,47
16	4-kloorianiliini	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobentseeni	1,9	
18	Kanelihappo	1,9	
19	Bentsoehappo	1,9	pKa = 4,19
20	p-kresoli	1,9	pKa = 10,17
21	Kanelihappo	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anisoli	2,1	
23	Metyylibentsoaatti	2,1	
24	Bentseeni	2,1	
25	3-metyylibentsoehappo	2,4	pKa = 4,27
26	4-klorofenoli	2,4	pKa = 9,1
27	Trikloroetyleeni	2,4	
28	Atrasiini	2,6	
29	Etyylibentsoaatti	2,6	
30	2,6-diklorobentsonitriili	2,6	
31	3-klorobentsoehappo	2,7	pKa = 3,82
32	Tolueeni	2,7	
33	1-naftoli	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dikloroanilini	2,8	
35	Klorobentseeni	2,8	
36	Allyylifenyylieetteri	2,9	
37	Bromobentseeni	3,0	

▼B

Nro	Vertailuaine	log P_{ow}	pKa
38	Etyylibentseeni	3,2	
39	Bentsofenoni	3,2	
40	4-fenyylifenoli	3,2	pKa = 9,54
41	Tymoli	3,3	
42	1,4-diklorobentseeni	3,4	
43	Difenyyliamiini	3,4	pKa = 0,79
44	Naftaleeni	3,6	
45	Fenyylibentsoaatti	3,6	
46	Isopropyylibentseeni	3,7	
47	2,4,6-trikloorifenoli	3,7	pKa = 6
48	Bifenyyli	4,0	
49	Bentsyylibentsoaatti	4,0	
50	2,4-dinitro-6 sek. butyylifenoli	4,1	
51	1,2,4-triklooribentseeni	4,2	
52	Dodekaanihappo	4,2	
53	Difenyylieetteri	4,2	
54	n-butyylibentseeni	4,5	
55	Fenantreeni	4,5	
56	Fluoranteeni	4,7	
57	Dibentsyyli	4,8	
58	2,6-difenyylipyridiini	4,9	
59	Trifenyyliamiini	5,7	
60	DDT	6,2	
	Muita vertailuaineita, joilla on pieni log P_{ow} -arvo		
1	Nikotiinihappo	- 0,07	

▼B

A.9 LEIMAHDUSPISTE

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa selvittää tutkittavan aineen syttyvyys ennen testauksen aloittamista. Testimenetelmää voidaan soveltaa nestemäisiin aineisiin, joiden höyryt ovat sytytettävissä sytytyslähteen avulla. Tässä luetellut testimenetelmät ovat luotettavia vain menetelmien yhteydessä mainituilla leimahduspistealueilla.

Menetelmän valinnassa on otettava huomioon mahdolliset kemialliset reaktiot tutkittavan aineen ja näytteenpitimen välillä.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Leimahduspiste on alin lämpötila, korjattuna 101,325 kPa:n paineeseen, jossa neste testimenetelmässä kuvatuissa olosuhteissa muodostaa niin paljon höyryä, että testausastiassa muodostuu syttyvä höyryn ja ilman seos.

Yksiköt: ^{o}C

$t = T - 273,15$

(t annetaan Celsius-asteina ja T kelvineinä)

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Näyte pannaan testausastiaan ja se kuumennetaan tai jäähdytetään testilämpötilaan testimenetelmän ohjeiden mukaan. Tämän jälkeen selvitetään syttymiskokeiden avulla, leimahtaako näyte testilämpötilassa vai ei.

1.5 LAATUKRITEERIT

1.5.1 **Toistettavuus**

Toistettavuus vaihtelee leimahduspistealueen ja testimenetelmän mukaan. Maksimiarvo on 2 ^{o}C.

1.5.2 **Herkkyys**

Herkkyys vaihtelee testimenetelmän mukaan.

1.5.3 **Spesifisyys**

Joidenkin testimenetelmien spesifisyys rajoittuu määrättyyn leimahduspistealueeseen ja vaihtelee aineen ominaisuuksien (esimerkiksi viskositeetin) mukaan.

▼B

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelutoimet**

Näyte asetetaan laitteeseen kohdan 1.6.3.1 tai 1.6.3.2. mukaan.

Turvallisuussyistä suositellaan, että voimakkaasti reagoivien tai myrkyllisten aineiden kohdalla valitaan menetelmä, jossa näyte on pieni, noin 2 cm^3.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Turvallisuusmääräysten mukaan laite on pidettävä paikassa, jossa ei ole vetoa.

1.6.3 **Työjärjestys**

1.6.3.1 *Tasapainomenetelmä*

Katso seuraavia standardeja: ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2 *Tasapainottomuusmenetelmä*

Abelin laite:

Katso seuraavia standardeja: BS 2000 osa 170, NF M07.011, NF T66-009.

Abel-Penskyn laite:

Katso seuraavia standardeja: EN 57, DIN 51755 osa 1 (lämpötila-alue 5-65 °C), DIN 51755 osa 2 (lämpötilat alle 5 °C), NF M07-036.

Tagin laite:

Katso standardia ASTM D 56.

Pensky- Martensin laite:

Katso seuraavia standardeja: ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Huomautuksia:

Jos kohdan 1.6.3.2 mukaisen tasapainottomuusmenetelmän tuloksena saadaan leimahduspiste, joka on 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C tai 55 ± 2 °C, tulos on vahvistettava tasapainomenetelmän avulla samaa laitetta käyttäen.

Ilmoituskelpoisia ovat vain sellaiset menetelmät, joilla saadaan leimahduspisteen lämpötila.

Nesteiden, jotka sisältävät liuotinta ja joiden viskositeetti on suuri (esimerkiksi maalien ja kumien) leimahduspisteen määritykseen saa käyttää ainoastaan laitteita ja testimenetelmiä, jotka soveltuvat suuren viskositeetin omaavien nesteiden leimahduspisteen määritykseen.

Katso seuraavia standardeja: ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 osa 1.

▼B

2. **TIEDOT**

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet),

— käytetty menetelmä ja mahdolliset poikkeamat,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4. **VIITTEET**

Viitteitä ei ole.

▼B

A.10 **SYTITVYYS (KIINTEÄT AINEET)**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa selvittää tutkittavan aineen mahdolliset räjähtävät ominaisuudet ennen testiä.

Testimenetelmää tulee soveltaa vain jauhemaisiin, rakeisiin tai pastamaisiin aineisiin.

Koska ei ole käytännöllistä testata kaikkia syttyviä aineita, vaan vain sellaisia, jotka palavat nopeasti tai joiden palamisominaisuudet ovat joltakin osalta erityisen vaaralliset, herkästi syttyväksi aineeksi luokitellaan vain sellaiset, joiden palamisnopeus ylittää määrätyn rajaarvon.

Hehku, joka etenee metallijauheessa, voi olla erityisen vaarallinen palon sammutusvaikeuksien vuoksi. Metallijauheita on pidettävä herkästi syttyvinä, jos hehku etenee niissä massan läpi määrätyssä ajassa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Palamisaika sekunteina.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole määritetty.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Aine muotoillaan yhteneväksi nauhaksi tai jauhelinjaksi, jonka pituus on noin 250 mm. Alustavan seulontatestin avulla määritetään, eteneekö kyteminen tai liekki, kun aine sytytetään kaasuliekillä. Jos liekki tai kyteminen etenee yli 200 mm annetun ajan kuluessa, aineen palamisnopeus määritetään kattavan testiohjelman avulla.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole määritetty.

▼B

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Alustava seulontatesti**

Aine muotoillaan yhteneväksi nauhaksi tai jauhelinjaksi, jonka pituus on noin 250 mm, leveys 20 mm ja korkeus 10 mm, palamattomalle, ei-huokoiselle ja heikosti lämpöä johtavalle alustalle.

Kaasupolttimen kuumaa liekkiä (vähimmäishalkaisija 5 mm) pidetään jauhelinjan toisessa päässä, kunnes jauhe syttyy tai enintään 2 minuuttia (5 minuuttia metallien ja metalliseosten kohdalla). Seurataan, eteneekö palaminen 200 mm linjaa pitkin 4 minuutin testijakson aikana (40 minuuttia metallijauheiden kohdalla). Jos aine ei syty eikä liekki tai kyteminen etene 200 mm:ä 4 minuutin testijakson aikana (40 minuuttia metallijauheiden kohdalla), ainetta ei pidetä herkästi syttyvänä, eikä lisätestausta tarvita. Jos aineen palaminen etenee jauhelinjaa pitkin 200 mm alle 4 minuutissa (tai alle 40 minuutissa metallijauheiden kohdalla), testausta on jatkettava jäljempänä kuvatun menetelmän mukaan (jatka kohdasta 1.6.2).

1.6.2 **Palamisnopeuden testaus**

1.6.2.1 *Valmistelutoimet*

Jauhemaista tai rakeista ainetta pannaan kevyelti 250 mm pitkään muottiin, jonka kolmionmuotoisen läpileikkauksen sisäkorkeus on 10 mm ja leveys 20 mm. Muotin pituussuunnassa on molemmille sivuille kiinnitetty kaksi metallilevyä siten, että levyjen yläreuna on 2 mm muotin reunan yläpuolella (katso kuvaa). Muotti pudotetaan kolme kertaa 2 cm:n korkeudelta kiinteälle pinnalle. Tarvittaessa ainetta lisätään muottiin. Tämän jälkeen sivulevyt poistetaan ja ylimääräinen aines kaavitaan pois. Muotille asetetaan palamaton, ei-huokoisesta ja heikosti lämpöä johtavasta aineesta valmistettu aluslevy, laite käännetään ja muotti poistetaan.

Pastamaiset aineet levitetään nauhana, jonka pituus on 250 mm ja läpileikkaus noin 1 cm^2, palamattomalle, ei-huokoiselle ja lämpöä heikosti johtavalle alustalle.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

Jos aine on herkkä kosteudelle, testi on tehtävä mahdollisimman pian aineen säilöstä ottamisen jälkeen.

1.6.2.3 *Työjärjestys*

Aseta näyte vetokaappiin.

Veto on säädettävä sellaiseksi, ettei laboratoriotiloihin pääse savua. Vedon voimakkuus ei saa vaihdella testin aikana. Laitteen ympärille pystytetään suojaseinä vetoa vastaan.

Näytenauha sytytetään toisesta päästä kaasupolttimen kuumalla liekillä, jonka halkaisija on vähintään 5 mm. Kun palaminen on edennyt 80 mm:n verran, mitataan palamisnopeus seuraavalla

▼B

100 mm:n osuudella. Testi tehdään kuusi kertaa käyttäen aina puhdasta ja kylmää alustaa, ellei positiivista tulosta saavuteta aiemmin.

2. **TIEDOT**

Arvioinnissa käytetään alustavasta seulontatestistä saatua palamisaikaa (1.6.1) ja enintään kuudesta testistä saatua lyhyintä palamisaikaa (1.6.2.3).

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet),

— testattavan aineen kuvaus, sen fysikaalinen olomuoto ja kosteuspitoisuus,

— tulokset alustavasta seulonta- ja palamisnopeustestistä, jos tällaiset on tehty,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Jauhemaisia, rakeisia tai pastamaisia aineita pidetään herkästi syttyvinä, jos niiden palamisaika minkä tahansa kohdassa 1.6.2 kuvatun testin tuloksena on lyhyempi kuin 45 sekuntia. Metalli- tai metalliseosjauheita pidetään herkästi syttyvinä, jos ne voidaan sytyttää ja liekin tai reaktioalueen leviäminen koko näytteeseen kestää enintään kymmenen minuuttia.

4. **VIITTEET**

(1) NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

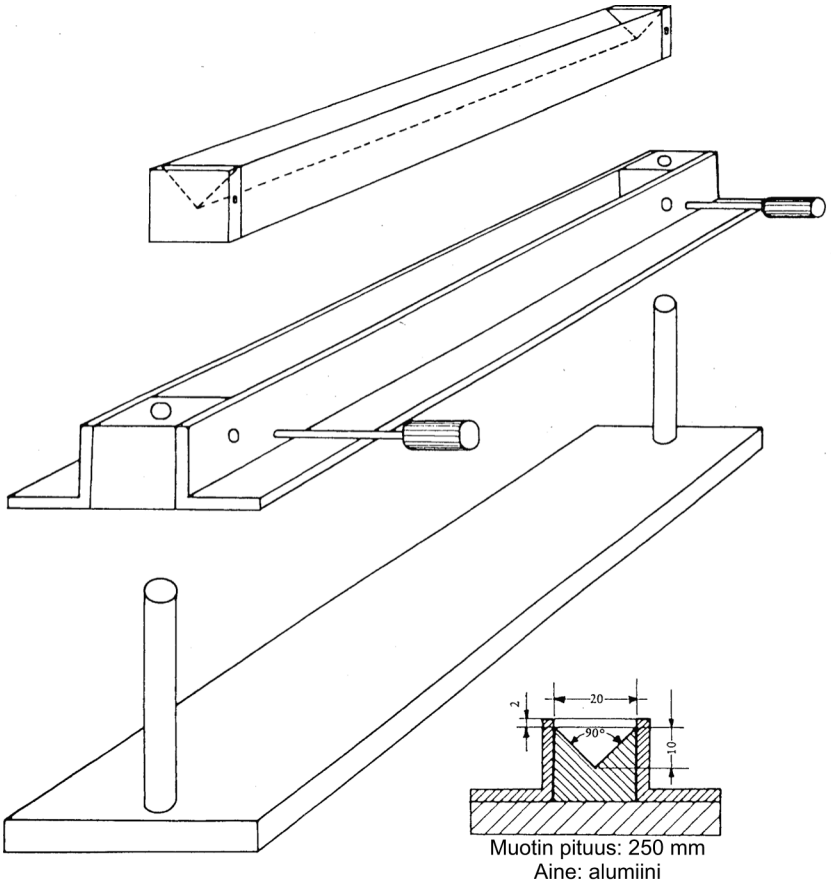
▼B

Liite

Kuva

Muotti ja tarvikkeet näytteen valmistelua varten

(Kaikki mitat ovat millimetreinä)



▼B

A.11 SYTTYVYYS (KAASUT)

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä voidaan määrittää pitoisuusalueet, joilla ilma-kaasuseos syttyy huoneenlämpötilassa (noin 20 °C:ssa) ja normaalissa ilmanpaineessa. Tutkittavan kaasun ja ilman seoksia altistetaan kaasupitoisuuksia suurentaen sähkökipinälle ja tarkkaillaan, syttyykö seos vai ei.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Syttyvyysalue on alimman ja ylimmän räjähdysrajan välinen pitoisuusalue. Alin ja ylin räjähdysraja ovat ne syttyvän kaasun ja ilman seoksen pitoisuudet, joissa ei synny leimahdusta.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole määritetty.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Ilman kaasupitoisuutta suurennetaan asteittain ja jokaisen vaiheen pitoisuuden seos altistetaan sähkökipinälle.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole määritetty.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Laite**

Testausastia on pystysuora lasisylinteri, jonka sisähalkaisija on vähintään 50 mm ja korkeus vähintään 300 mm. Sytytyselektrodit sijaitsevat 3–5 mm:n etäisyydellä toisistaan ja 60 mm:n korkeudella sylinterin pohjasta. Sylinterissä on paineentasausaukko. Laitteen ympärillä on oltava suoja mahdollisten räjähdysvahinkojen estämiseksi.

Kipinälähteenä käytetään 0,5 sekunnin induktiokipinää, joka saadaan korkeajännitemuuntajasta, jonka lähtöjännite on 10-15 kV (tehontarve enintään 300 W). Esimerkki soveltuvasta laitteesta on viitteessä (2).

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Testi tehdään huoneenlämpötilassa (noin 20 °C:ssa).

▼B

1.6.3 **Työjärjestys**

Lasisylinteriin pumpataan annostuspumpulla kaasu-ilmaseosta, jonka pitoisuus tunnetaan. Seoksen läpi johdetaan kipinä ja liekin mahdollista irtaantumista kipinälähteestä sekä sen itsenäistä etenemistä tarkkaillaan. Kaasupitoisuutta muutetaan yhden tilavuusprosentin askelin, kunnes syttyminen tapahtuu edellä kuvatulla tavalla.

Jos kaasun kemiallisen rakenteen perusteella voidaan olettaa, että kaasu ei ole syttyvää, ja kaasun ja ilman seoksen stökiometrimen koostumus voidaan testata 1 %:n askelin, tarvitsee testata vain seokset, joiden pitoisuus on enintään 10 % suurempi tai pienempi kuin tämä koostumus.

2. **TIEDOT**

Määrityksen ainoa merkitsevä tieto on liekin eteneminen.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet),

— käytetyn laitteen kuvaus mittatietoineen,

— testilämpötila,

— testatut pitoisuudet ja saadut tulokset,

— testin tulos: syttyvä kaasu tai herkästi syttyvä kaasu,

— jos kaasu todetaan syttymättömäksi, on ilmoitettava, millä pitoisuusalueella kaasua on testattu 1 %:n askelin,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4. **VIITTEET**

(1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W. Berthold, D. Conrad, T, Grewer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. ”Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen”. Chem.-Ing.-Tech., 1984, vol. 56, 2, 126–127.

▼B

A.12 **SYTTYVYYS (KOSKETUS VEDEN KANSSA)**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Tällä testimenetelmällä voidaan määrittää, kehittääkö testattava aine veden tai kostean ilman kanssa kosketuksiin joutuessaan vaarallisia määriä kaasua tai kaasuja, jotka voivat olla herkästi syttyviä.

Testimenetelmää voidaan soveltaa sekä kiinteisiin että nestemäisiin aineisiin. Menetelmää ei voi soveltaa aineisiin, jotka syttyvät itsestään joutuessaan kosketuksiin ilman kanssa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Herkästi syttyviä ovat aineet, jotka veden tai kostean ilman kanssa kosketuksiin joutuessaan muodostavat vaarallisia määriä herkästi syttyviä kaasuja miniminopeudella 1 l/kg/h.

1.3 MENETELMÄN PERIAATE

Ainetta testataan jäljempänä kuvatun vaiheittaisen sarjan mukaan. Jos syttymistä esiintyy, sarjaa ei tarvitse jatkaa. Jos tiedetään, että aine ei reagoi voimakkaasti veden kanssa, voidaan edetä vaiheeseen 4 (1.3.4).

1.3.1 **Vaihe 1**

Näyte pannaan kaukaloon, jossa on 20-celsiusasteista tislattua vettä. Todetaan, syttyykö muodostunut kaasu vai ei.

1.3.2 **Vaihe 2**

Näyte pannaan suodatinpaperille, joka kelluu 20-celsiusasteisen tislatun veden pinnalla sopivassa astiassa. Todetaan, syttyykö muodostunut kaasu vai ei. Suodatinpaperia tarvitaan vain pitämään näyte koossa mahdollisen syttymisen helpottamiseksi.

1.3.3 **Vaihe 3**

Näyte muotoillaan keoksi, jonka korkeus on noin 2 cm ja läpimitta noin 3 cm. Keolle kaadetaan muutama tippa vettä, ja todetaan, syttyykö muodostunut kaasu vai ei.

1.3.4 **Vaihe 4**

Näytettä sekoitetaan 20-celsiusasteiseen tislattuun veteen ja kaasun muodostumisnopeus mitataan tunnin välein seitsemän tunnin ajan. Jos muodostumisnopeus on epäsäännöllinen tai kasvava seitsemän tunnin jälkeen, mittausaika voidaan pidentää enintään viideksi päiväksi. Testi voidaan keskeyttää, jos nopeus missä tahansa vaiheessa ylittää arvon 1 l/kg/h.

▼B

1.4 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole määritetty.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole määritetty.

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

1.6.1 **Vaihe 1**

1.6.1.1 *Testiolosuhteet*

Testi tehdään huoneenlämmössä (noin 20 °C:ssa).

1.6.1.2 *Työjärjestys*

Pieni määrä näytettä, jonka läpimitta on noin 2 mm, pannaan tislattua vettä sisältävään kaukaloon. Todetaan, (i) muodostuuko kaasua ja (ii) syttyykö kaasu. Jos kaasu syttyy, testiä ei tarvitse jatkaa, koska aine luokitellaan tällöin vaaralliseksi.

1.6.2 **Vaihe 2**

1.6.2.1 *Laite*

Sopivassa astiassa, esimerkiksi 100 ml:n haihdutusastiassa, pidetään 20-celsiusasteista tislattua vettä. Veden pinnalla kelluu suodatinpaperi.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

Testi tehdään huoneenlämmössä (noin 20 °C:ssa).

1.6.2.3 *Työjärjestys*

Pieni määrä näytettä (läpimitta noin 2 mm) asetetaan suodatinpaperin keskelle. Todetaan, (i) muodostuuko kaasua ja (ii) syttyykö kaasu. Jos kaasu syttyy, testausta ei tarvitse jatkaa, koska aine luokitellaan tällöin vaaralliseksi.

1.6.3 **Vaihe 3**

1.6.3.1 *Testiolosuhteet*

Testi tehdään huoneenlämmössä (noin 20 °C:ssa).

1.6.3.2 *Työjärjestys*

Näyte muotoillaan keoksi, jonka korkeus on noin 2 cm ja läpimitta noin 3 cm. Keon huipulle tehdään kuoppa, johon kaadetaan muutama tippa vettä. Todetaan, (i) muodostuuko kaasua ja (ii) syttyykö kaasu. Jos kaasu syttyy, testausta ei tarvitse jatkaa, koska aine luokitellaan tällöin vaaralliseksi.

▼B

1.6.4 **Vaihe 4**

1.6.4.1 *Laite*

Laite rakennetaan kuvan mukaisesti.

1.6.4.2 *Testiolosuhteet*

Katsotaan, onko näytesäiliössä jauhetta (hiukkaskoko < 500 μm). Jos tällaisen jauheen paino-osuus ylittää 1 % tai jos näyte on murenevaa, koko näyte on jauhettava ennen testausta, jotta hiukkaskoko olisi pienempi varastoinnin ja käsittelyn aikana. Muuten näytettä testataan vastaanotetussa muodossa. Testi tehdään huoneenlämmössä (noin 20 °C:ssa) ja yhden ilmakehän paineessa.

1.6.4.3 *Työjärjestys*

Laitteen tiputussuppiloon kaadetaan 10–20 ml vettä ja erlenmeyerpulloon pannaan 10 g näytettä. Muodostuneen kaasun tilavuus voidaan mitata millä tahansa sopivalla menetelmällä. Tiputussuppilon hana avataan ja samalla käynnistetään sekuntikello. Kaasunmuodostus mitataan kerran tunnissa seitsemän tunnin ajan. Jos muodostumisnopeus on epäsäännöllinen tai kasvava seitsemän tunnin jälkeen, mittausaikaa voidaan pidentää enintään viideksi päiväksi. Testi voidaan keskeyttää, jos nopeus ylittää arvon 1 l/kg/h missä tahansa vaiheessa. Testi tehdään kolme kertaa.

Jos kaasun kemiallista koostumusta ei tunneta, kaasu on analysoitava. Jos kaasu sisältää herkästi syttyviä osia eikä tiedetä, onko koko seos herkästi syttyvä, on valmistettava koostumukseltaan samanlainen seos, joka testataan menetelmän A. 11 mukaisesti.

2. **TIEDOT**

Aine katsotaan vaaralliseksi, jos:

— se syttyy itsestään testin jossakin vaiheessa, tai

— jos syttyvää kaasua muodostuu nopeudella, joka ylittää arvon 1 l/kg/h.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet),

— selvitys mahdollisista aineen valmistelutoimista,

▼B

— testitulokset (vaiheet 1, 2, 3 ja 4),

— muodostuneen kaasun kemiallinen koostumus,

— kaasun muodostumisnopeus, jos vaihe 4 suoritetaan (1.6.4),

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4. **VIITTEET**

(1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

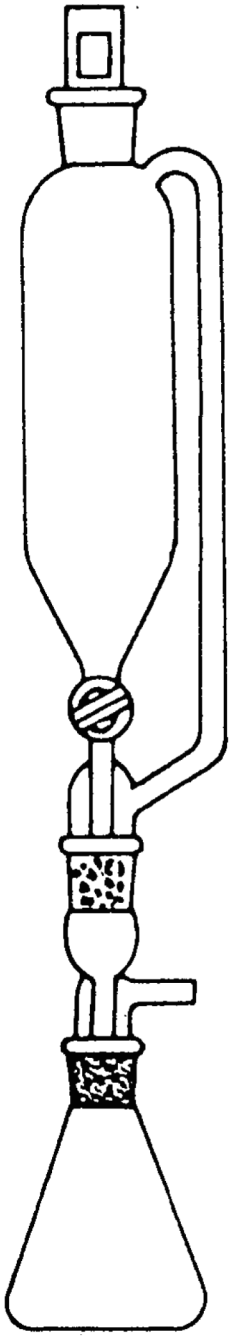
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Liite

Kuva

Laite



▼B

A.13 **KIINTEIDEN AINEIDEN JA NESTEIDEN ITSESYTTYVYYS**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Testimenetelmää voidaan soveltaa kiinteisiin ja nestemäisiin aineisiin, jotka pieninä määrinä syttyvät itsestään nopeasti jouduttuaan kosketuksiin huoneenlämpöisen (20 °C) ilman kanssa.

Testimenetelmä ei kata aineita, jotka syttyvät vain siinä tapauksessa, että niitä pidetään huoneenlämpöisessä ilmassa useita tunteja tai päiviä tai jos lämpötilaa korotetaan.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Aine luokitellaan itsestään syttyväksi, jos se syttyy tai aiheuttaa hiiltymistä kohdassa 1.6 kuvatuissa olosuhteissa.

Nesteiden itsesyttyvyyden testauksessa voidaan myös tarvita menetelmää A.15 Itsesyttymislämpötila (nesteet ja kaasut).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole määritetty.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Näyte (kiinteä tai nestemäinen) pannaan inertille alustalle ja saatetaan kosketuksiin huoneenlämpöisen ilman kanssa viideksi minuutiksi. Jos neste ei syty tässä ajassa, se imeytetään suodatinpaperiin ja pannaan huoneenlämpöiseen (20 °C) ilmaan viideksi minuutiksi. Jos kiinteä aine tai neste syttyy tai jos neste sytyttää suodatinpaperin tai aiheuttaa sen hiiltymisen, aine luokitellaan itsestään syttyväksi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Toistettavuus: koska itsesyttyvyysominaisuus on tärkeä turvallisuustekijä, yksi positiivinen tulos riittää aineen luokittelemiseksi itsestään syttyväksi.

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

1.6.1 **Laite**

Posliinikuppiin, jonka läpimitta on noin 10 cm, pannaan noin 5 mm:n kerros huoneenlämpöistä (noin 20 °C) piimaata.

Huomautus:

Piimaa tai muu vastaava inertti, yleisesti saatavilla oleva aine katsotaan esimerkiksi aineesta, johon testattavaa ainetta voi kaataa vahingon sattuessa.

Kuivaa suodatinpaperia tarvitaan sellaisten nesteiden testaukseen, jotka inertillä alustalla pidettyinä eivät syty joutuessaan ilman kanssa kosketuksiin.

▼B

1.6.2 **Testin suorittaminen**

a) *Jauhemaiset kiinteät aineet*

1–2 cm^3 testattavaa jauhetta kaadetaan noin 1 m:n korkeudelta palamattomalle alustalle. Samalla tarkkaillaan, syttyykö aine palamaan pudotessaan tai viiden minuutin kuluessa alustalle asettumisesta.

Ellei syttymistä tapahdu, koe tehdään kuusi kertaa.

b) *Nesteet*

Noin 5 cm^3 testattavaa nestettä kaadetaan preparoituun posliinikuppiin. Samalla tarkkaillaan, syttyykö neste viiden minuutin kuluessa.

Ellei neste syty kuuden kokeen aikana, jatketaan seuraavilla kokeilla:

0,5 ml näytenestettä annostellaan ruiskusta suodatinpaperille. Samalla tarkkaillaan, syttyykö suodatinpaperi palamaan tai hiiltyykö se viiden minuutin kuluessa nesteen lisäyksen jälkeen. Ellei syttymistä tai hiiltymistä tapahdu, testi tehdään kolme kertaa.

2. **TIEDOT**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Testi voidaan keskeyttää heti kun mistä tahansa testin osasta saadaan myönteinen tulos.

2.2 ARVIOINTI

Jos aine syttyy viiden minuutin kuluessa siitä, kun sitä on pantu inertille alustalle ja saatettu kosketuksiin ilman kanssa, tai jos neste sytyttää suodatinpaperin tai aiheuttaa sen hiiltymisen viiden minuutin kuluessa, aine luokitellaan itsestään syttyväksi.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet),

— testitulokset,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4. **VIITTEET**

(1) NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangereous Goods, Test and Criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

A.14 RÄJÄHTÄVYYS

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Menetelmä koostuu testiohjelmasta, jonka avulla voidaan määrittää, onko kiinteä tai pastamainen aine räjähdysaltis, kun se altistetaan liekille (lämpöherkkyys) tai iskulle tai kitkalle (mekaaninen herkkyys) ja onko neste räjähdysaltis, kun se altistetaan liekille tai iskulle.

Menetelmä on kolmiosainen:

a) lämpöherkkyyden testaus (1);

b) iskuherkkyyden testaus (1);

c) kitkaherkkyyden testaus (1).

Menetelmän avulla voidaan selvittää todennäköisyys sille, että aine räjähtää, kun se altistetaan määrätyille tavallisille ärsykkeille. Menetelmää ei ole tarkoitettu käytettäväksi sen selvittämiseen, voiko aine yleensä räjähtää.

Menetelmällä voidaan määrittää, liittyykö aineeseen lämpöherkkyydestä ja mekaanisesta herkkyydestä aiheutuvaa räjähdysvaaraa direktiivin kuvaamissa erikoisolosuhteissa. Menetelmä perustuu joukkoon laitetyyppejä, joita käytetään yleisesti monissa maissa (1) ja joilla yleensä saadaan selkeitä tuloksia. Todettakoon, että menetelmä ei ole lopullinen. Myös muita laitteita voidaan käyttää, edellyttäen, että ne ovat kansainvälisesti tunnustettuja ja että tulokset ovat riittävän hyvin korreloitavissa.

Testiä ei tarvitse suorittaa, jos käytettävissä olevien termodynaamisten tietojen (esimerkiksi muodostumis- tai hajoamislämmön) tai määrättyjen reaktiivisten ryhmien (2) rakennekaavasta puuttumisen perusteella avulla voidaan täysin varmasti osoittaa, että aine ei voi hajota nopeasti muodostaen kaasuja tai lämpöä, eikä siihen näin ollen liity minkäänlaista räjähdysvaaraa. Nesteiden kohdalla ei vaadita kitkaherkkyyden testausta.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Räjähtävä:

Aineet, jotka voivat räjähtää liekin vaikutuksesta tai jotka ovat herkkiä iskulle tai kitkalle spesifioidussa laitteessa (tai ovat mekaanisesti herkempiä kuin 1,3-dinitrobentseeni vaihtoehtoisessa laitteessa).

1.3 VERTAILUAINEET

1,3-dinitrobentseeni, tekninen kiteinen tuote, joka on läpäissyt 0,5 mm:n seulan, käytetään kitka- ja iskumenetelmissä.

Perhydro-l,3,5-trinitro-l,3,5-triatsiini (RDX, heksogeeni, sykloniini — CAS 121-82-4); uudelleenkiteytetty vesipitoisesta sykloheksanonista, märkäseulottu 250 mm:n tarkkuudella ja pidätetty 150 µm:n seulaan sekä kuivattu 130 ± 2 °C:ssa (4 tuntia) toista kitka- ja iskutestisarjaa varten.

▼B

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

On tarpeen tehdä alustavat testit, joiden avulla voidaan määrittää turvalliset olosuhteet kolmelle herkkyystestille.

1.4.1 **Käsittelyturvallisuustestit (3)**

Ennen varsinaisen testin aloittamista on turvallisuussyistä altistettava hyvin pieniä näytemääriä (noin 10 mg) kuumentamiselle avoimessa kaasuliekissä tai vasaran ja alasimen tai sopivan kitkakoneen avulla aikaansaatavalle kitkalle. Tarkoituksena on selvittää, onko aineen herkkyys ja räjähtävyys sellaista luokkaa, että kuvatut herkkyystestit, etenkin lämpöherkkyyden kohdalla, on henkilövahinkojen välttämiseksi suoritettava erityistä varovaisuutta noudattaen.

1.4.2 **Lämpöherkkyys**

Näytettä kuumennetaan teräsputkessa, joka on suljettu sopivalla reiällä varustetulla mittauslaipalla. Testin avulla selvitetään, onko aine räjähdysherkkä hyvin kuumissa olosuhteissa ja ahtaassa tilassa.

1.4.3 **Mekaaninen herkkyys (isku)**

Näyte altistetaan iskulle pudottamalla sen päälle määrätty massa määrätyltä korkeudelta.

1.4.4 **Mekaaninen herkkyys (kitka)**

Kiinteä tai pastamainen näyte altistetaan kitkalle vakiopintojen välillä käyttäen annettua kuormaa ja suhteellista liikettä.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole määritelty.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Lämpöherkkyys (liekin vaikutus)**

1.6.1.1 *Laite*

Laitteessa on kuumennus- ja suojaosaan asennettu kertakäyttöinen teräsputki, jossa on uudelleen käytettävä suljinosa (kuva 1). Syövädetystä teräslevystä (katso liitettä) valmistettujen putkien sisähalkaisija on 24 mm, pituus on 75 mm ja seinän paksuus 0,5 mm. Putken avoimessa päässä on laippaliitos mittauslaippaa varten. Paineenkestävä mittauslaippa kiinnitetään putkeen kaksiosaisella ruuviliitännällä (mutterilla ja kierrelaipalla). Mutteri ja kierrelaippa on valmistettu kromi-mangaaniteräksestä (katso liitettä), joka on kipinöimätöntä 800 °C:een asti. Lämmönkestävästä teräksestä valmistettujen, useilla eri reiänhalkaisijoilla varustettujen mittauslaippojen paksuus on 6 mm.

▼B

1.6.1.2 *Testiolosuhteet*

Yleensä aine testataan sellaisenaan. Joissakin tapauksissa (esimerkiksi jos aine on puristetussa, valetussa tai muulla tavoin tiivistetyssä muodossa) aine on murskattava ennen testiä.

Kiinteiden aineiden kussakin testauksessa käytettävä massa määritetään kaksivaiheisen kuiva-ajon avulla. Taarattuun putkeen pannaan 9 cm^3 ainetta, joka sullotaan putkeen tämän koko poikkileikkauspinta-alaan kohdistuvalla 80 N:n voimalla. Turvallisuussyistä ja tapauksissa, joissa näytteen fyysinen muoto voi muuttua puristuksen vaikutuksesta, voidaan käyttää muuntyyppistä täyttömenetelmää (sullomista ei voi käyttää esimerkiksi hyvin kitkaherkkien aineiden kohdalla). Jos aine kestää puristamista, täyttöä ja sullomista jatketaan, kunnes aineen yläpinnan etäisyys putken reunasta on 55 mm. Määritetään kokonaismassa, joka on käytetty putken täyttämiseen 55 mm:iin asti, minkä jälkeen tehdään vielä kaksi lisäystä, kumpikin 80 N:n voimalla sulloen. Tämän jälkeen ainetta joko lisätään sulloen tai poistetaan niin paljon, että aineen yläpinta on 15 mm:n etäisyydellä putken reunasta. Tehdään toinen kuiva-ajo, joka aloitetaan sullotulla massalla, joka on kolmasosa ensimmäisen ajon kokonaismassasta. Kaksi tällaista määrää lisätään sulloen 80 N:n voimalla, ja aineen yläpinta säädetään ainetta lisäämällä tai poistamalla 15 mm:n tasolle putken yläpinnasta. Kussakin kokeessa käytetään toisessa ajossa määritettyä massaa; täyttö tehdään kolmella yhtä suurella määrällä, joista jokainen puristetaan 9 cm^3:iin tarpeellista voimaa käyttäen (apuna voidaan käyttää välirenkaita).

Nesteet ja geelit täytetään putkeen 60 mm:n korkeuteen. Täytössä on erityisesti varottava tyhjien kohtien muodostumista. Kierrelaippa ohjataan putkeen yläkautta, valittu mittauslaippa asetetaan paikoilleen, hieman molybdeeni-disulfidipohjaista voiteluainetta lisätään ja mutteri kiristetään. On tärkeää tarkistaa, että mitään aineista ei ole jäänyt laipan ja levyn väliin tai kierteisiin.

Kuumennus tehdään propaanilla, joka otetaan kaasupullosta. Sylinterissä on oltava paineensäädin (60–70 mbar). Kaasun on kuljettava mittarin ja jakotukin kautta tasaisesti (virtauksen tasaisuus voidaan todeta pohtimien liekeistä) neljään polttimeen, Pohtimien sijoitus testauskammion ympärille ilmenee kuvasta 1. Polttimet kuluttavat yhteensä noin 3,2 litraa propaania minuutissa. Myös muita polttokaasuja tai muita polttimia voidaan käyttää, mutta kuumennusnopeuden on tällöin oltava sama kuin kuvassa 3. Kaikkien laitteiden kuumennusnopeus on tarkistettava säännöllisesti kuvasta 3 ilmenevällä tavalla dibutyyliftalaatilla täytettyjen putkien avulla.

1.6.1.3 *Testin suorittaminen*

Jokaista testiä jatketaan, kunnes putki hajoaa tai kunnes sitä on kuumennettu viiden minuutin ajan. Jos testin tuloksena on putken hajoaminen vähintään kolmeen osaan, jotka joissakin tapauksissa voivat olla vielä kiinni toisissaan kapeilla metallikaistaleilla (katso kuvaa 2), aineen katsotaan räjähtäneen. Jos hajoamisosien määrä on pienempi tai jos hajoamista ei tapahdu, katsotaan, että räjähdystä ei ole tapahtunut.

▼B

Ensin tehdään kolmen testin sarja, jossa mittauslaipan aukon halkaisija on 6,0 mm. Ellei räjähdystä tapahdu, tehdään toinen kolmen testin sarja, jossa mittauslaipan aukon halkaisija on 2,0 mm. Jos jommankumman sarjan tuloksena on räjähdys, testejä ei tarvitse jatkaa.

1.6.1.4 *Arviointi*

Testitulos katsotaan positiiviseksi, jos jommankumman edellä kuvatun testisarjan aikana tapahtuu räjähdys.

1.6.2 **Mekaaninen herkkyys (isku)**

1.6.2.1 *Laite (kuva 4)*

Tyypillisen vasaralaitteen tärkeimmät osat ovat teräsvalukappale alustoineen, alasin, pylväs, ohjaimet, pudotuspainot, irrotuslaite ja näytteenpidin. Teräsalasin (halkaisija 100 mm ja korkeus 70 mm) on kiinnitetty ruuveilla teräskappaleeseen (pituus 230 mm, leveys 250 mm ja korkeus 200 mm). Teräskappale on teräsvalualustalla (pituus 450 mm, leveys 450 mm ja korkeus 60 mm). Pylväs on tehty saumattomasta teräksestä vedetystä putkesta, ja se sijaitsee pitimessä, joka on kiinnitetty ruuveilla teräskappaleen taakse. Laite on ankkuroitu massiiviseen sementtikappaleeseen (60 x 60 x 60 cm) ruuveilla siten, että ohjainkiskot ovat ehdottomasti pystysuorassa ja pudotuspaino pääsee putoamaan vapaasti. Painot (5 kg ja 10 kg) on valmistettu umpiteräksestä. Kummankin painon pää on karkaistua terästä (HRC 60-63), iskuhalkaisijaltaan vähintään 25 mm.

Näyte suljetaan iskulaitteeseen, jossa on kaksi päällekkäistä, konsentrista, umpiteräksistä sylinteriä, jotka sijaitsevat ontossa, sylinterinmuotoisessa teräsrenkaassa. Umpiterässylintereiden on oltava halkaisijaltaan 10 (- 0,003, - 0,005) mm ja korkeudeltaan 10 mm ja niissä on oltava kiillotettu pinta sekä pyöristetyt reunat (kaarevuussäde 0,5 mm). Sylintereiden kovuusarvon on oltava HRC 58-65. Onton sylinterin ulkohalkaisijan on oltava 16 mm, sisähalkaisijan 10 (+ 0,005, + 0,10) mm (kiillotettu sisäpinta) ja korkeuden 13 mm. Iskulaite on asennettu teräksiseen välialasimeen (halkaisija 26 mm ja korkeus 26 mm), joka on keskitetty renkaan avulla. Renkaassa on reiät savunpoistoa varten.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

Näytettä käytetään 40 mm^3 tai muu, vaihtoehtoiselle laitteelle sopiva määrä. Kiinteät aineet testataan kuivina ja valmistellaan seuraavasti;

a) Jauhetut aineet seulotaan (seulakoko 0,5 mm). Kaikki seulan läpäissyt aines käytetään.

b) Puristetut tai muulla tavoin tiivistetyt aineet murskataan ja seulotaan. Testissä käytetään seulontafraktiota 0,5–1 mm, jonka on edustettava alkuperäistä ainetta.

Aineet, jotka toimitetaan yleensä pastamuodossa, on mahdollisuuksien mukaan testattava kuivina tai vasta mahdollisimman täydellisen laimennusaineen poiston jälkeen. Nestemäisten aineiden testauksessa ylemmän ja alemman teräs sylinterin väliin on jätettävä 1 mm:n aukko.

▼B

1.6.2.3 *Testin suorittaminen*

Tehdään kuuden testin sarja pudottamalla 10 kg:n massa 0,40 m:n korkeudelta (40 J). Jos näiden testien aikana syntyy räjähdys, tehdään toinen kuuden testin sarja pudottamalla 5 kg:n massa 0,15 m:n korkeudelta (7,5 J). Jos käytetään muuntyyppistä laitetta, näytettä verrataan valittuun vertailuaineeseen käyttämällä hyväksyttyä menetelmää (esimerkiksi ylös-alas-tekniikkaa).

1.6.2.4 *Arviointi*

Testitulos katsotaan positiiviseksi, jos räjähdys (liekkeihin leimahtaminen tai muu raportti katsotaan räjähdykseksi) tapahtuu vähintään kerran määritetyllä iskulaitteella suoritetussa testissä tai jos näyte on vaihtoehtoisessa iskutestissä herkempi kuin 1,3-dinitrobentseeni tai RDX.

1.6.3 **Mekaaninen herkkyys (kitka)**

1.6.3.1 *Laite (kuva 5)*

Kitkalaitteen muodostavat valettu teräslaatta ja sille asennettu kitkayksikkö. Kitkayksikkö koostuu kiinteästä posliinitapista ja liikkuvasta posliinilaatasta, joka on kiinnitetty kahdessa ohjaimessa liikkuvaan vaunuun. Vaunu on kytketty sähkömoottoriin kytkentäsauvan, epäkeskoakselin ja sopivan vaihteiston kautta siten, että posliinilaatta liikkuu kerran edestakaisin 10 mm:n matkan posliinitapin alla. Posliinitappia voidaan kuormittaa esimerkiksi 120 tai 360 Newtonin voimalla.

Litteät posliinilaatat on valmistettu valkoisesta teknisestä posliinista (karheus 9–32 μm). Laattojen mitat ovat 25 mm (pituus) x 25 mm (leveys) x 5 mm (korkeus). Myös sylinterinmuotoinen posliinitappi on valkoista teknistä posliinia, pituudeltaan 15 mm ja halkaisijaltaan 10 mm. Tapin pää on pyöreä ja karhennettu (kaarevuussäde 10 mm).

1.6.3.2 *Testiolosuhteet*

Näytettä käytetään 10 mm^3 tai jokin muu vaihtoehtoiseen laitteeseen sopiva määrä.

Kiinteät aineet testataan kuivina ja valmistellaan seuraavasti:

a) Jauhetut aineet seulotaan (seulakoko 0,5 mm). Kaikki seulan läpäissyt aines käytetään.

b) Puristetut tai muulla tavalla tiivistetyt aineet murskataan ja seulotaan, Testissä käytetään alle 0,5 mm:n seulontafraktiota.

Aineet, jotka yleensä toimitetaan pastamuodossa, on mahdollisuuksien mukaan testattava kuivina. Jos ainetta ei voi valmistella kuivassa muodossaan, pasta (jolle tehdään ensin mahdollisimman täydellinen laimennusaineen poisto) muotoillaan kalvoksi, jonka paksuus on 0,5 mm, leveys 2 mm ja pituus 10 mm.

▼B

1.6.3.3 *Testin suorittaminen*

Posliinitappi asetetaan testattavan näytteen päälle ja kuormitus aktivoidaan. Testin aikana posiinilaatan karhennuksien on oltava poikittain liikkeen suuntaan nähden. On varmistettava, että tappi lepää näytteellä, että tarpeellinen määrä näyteainetta on tapin alla ja että laatta liikkuu oikealla tavoin tapin alla. Pastamaista ainetta pannaan laatalle käyttäen 2 × 10 mm:n uralla varustettua mittalevyä, jonka paksuus on 0,5 mm. Posliinilaatan on liikuttava posliinitapin alla 10 mm:n matka eteen ja taakse 0,44 sekunnissa. Laatan ja tapin pinnan osia saa käyttää vain kerran; kummankin tapin molempia päitä voidaan käyttää kahdessa testissä ja laatan kummankin pinnan pitää kestää kolme testiä.

Tehdään kuuden testin sarja 360 N:n kuormalla. Jos näiden testien aikana saadaan positiivinen tulos, tehdään toinen kuuden testin sarja 120 N:n kuormalla. Jos käytetään muuntyyppistä laitetta, näytettä verrataan valittuun vertailuaineeseen hyväksyttyä menetelmää (esimerkiksi ylös-alas-tekniikkaa) käyttäen.

1.6.3.4 *Arviointi*

Testin tulos katsotaan positiiviseksi, jos räjähdys (kuuluva rätinä, muu raportti tai leimahdus katsotaan räjähdykseksi) tapahtuu vähintään kerran määritetyllä kitkalaitteella suoritetuissa testeissä tai täyttää tätä vastaavan kriteerin vaihtoehtoisessa kitkatestissä.

2. **TIEDOT**

Periaatteessa aine katsotaan räjähdysvaaralliseksi direktiivin tarkoittamassa mielessä, jos lämpöherkkyys-, iskuherkkyys- tai kitkaherkkyystestistä saadaan positiivinen tulos.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot;

— näyteaineen tunnistustiedot, koostumus, puhtaus, kosteuspitoisuus jne.,

— aineen fyysinen muoto ja tiedot siitä, onko ainetta murskattu, rikottu tai seulottu,

— havainnot lämpöherkkyystesteistä (esimerkiksi näytteen massa ja sirpaleiden määrä),

— havainnot mekaanisista herkkyystesteistä (esimerkiksi huomattavan savumäärän muodostuminen tai raportoimaton täydellinen hajoaminen, liekit, kipinät, muu raportti ja rätinä),

— jokaisen testityypin tulokset,

— jos vaihtoehtoisia laitteita on käytetty, on esitettävä tieteellinen perustelu ja todisteet korrelaatiosta määritetyllä laitteella saatujen ja tätä vastaavalla laitteella saatujen tulosten välillä,

▼B

— kaikki käyttökelpoiset kommentit, kuten tulosten tulkinnan kannalta varten tärkeät viitteet vastaavien tuotteiden testauksiin,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

3.2 TULOSTEN TULKINTA JA ARVIOINTI

Testiraportissa on mainittava kaikki tulokset, joita pidetään virheellisinä, epänormaaleina tai ei-edustavina. Jos jokin tulos hylätään, on annettava selitys ja esitettävä tulos vaihtoehtoisesta tai täydentävästä testistä. Ellei epänormaalia tulosta voida selittää, se on hyväksyttävä sellaisenaan ja sitä on käytettävä aineen luokitukseen tuloksen mukaan.

4. **VIITTEET**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and Criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) Bretherick, L,. Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Buttervorths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K. H. and Swart, K. H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6-13 and 30-42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

▼B

Liite

Esimerkki ainespesifikaatiosta lämpöherkkyystestiä varten (katso standardia DIN 1623)

(1) Putki: ainespesifikaatio nro 1.0336.505 g

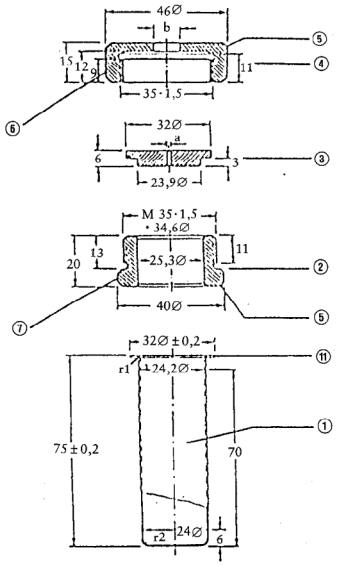
(2) Mittauslaippa: ainespesifikaatio nro 1.4873

(3) Kierrelaippa ja mutteri: ainespesifikaatio nro 1.3817

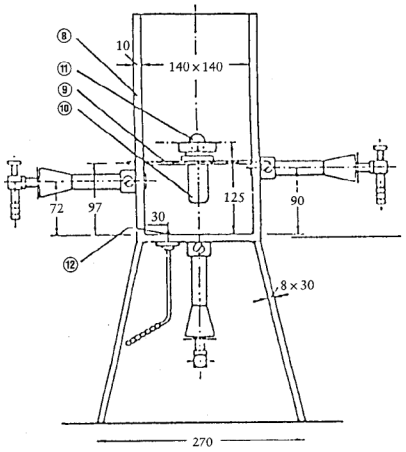
Kuva 1

Lämpöherkkyyden mittauslaite

(kaikki mitat ovat millimetreinä)



Kuva 1a Teräsputki varusteineen



Kuva 1b Kuumennus- ja suojalaite

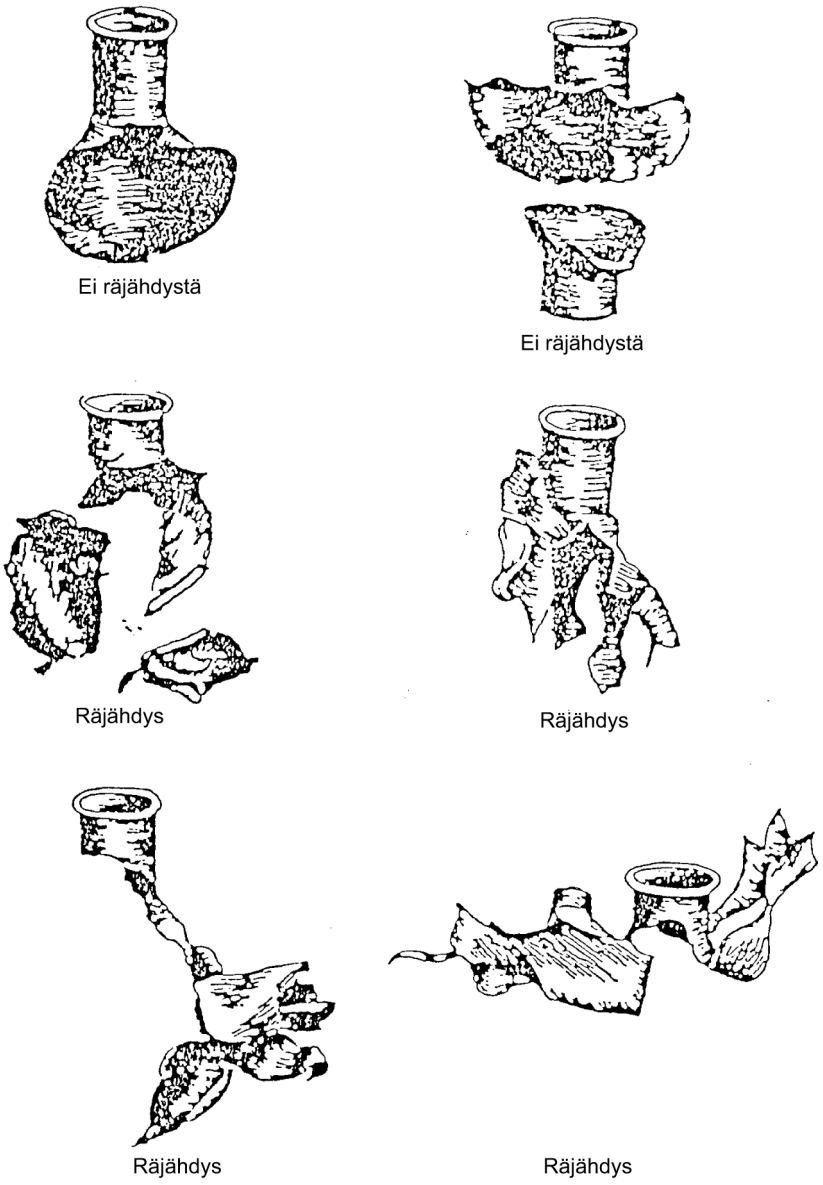
1. putki
1a. ulkolaippa
2. kierrelaippa; matalakitkakierre
3. mittauslaippa = halkaisija 2,0 tai 6,0 mm
4. mutteri b = halkaisija 10 mm
5. viistetty pinta
6. 2 upporuuvia, avainkoko 41
7. 2 upporuuvia, avainkoko 36
8. sirpaleenkestävä laatikko
9. putken 2 tukitankoa
10. asennettu putki
11. takapolttimen paikka; muut polttimet ovat näkyvissä
12. joutokäyntisuutin

▼B

Kuva 1a Teräsputki varusteineen

Kuva 2

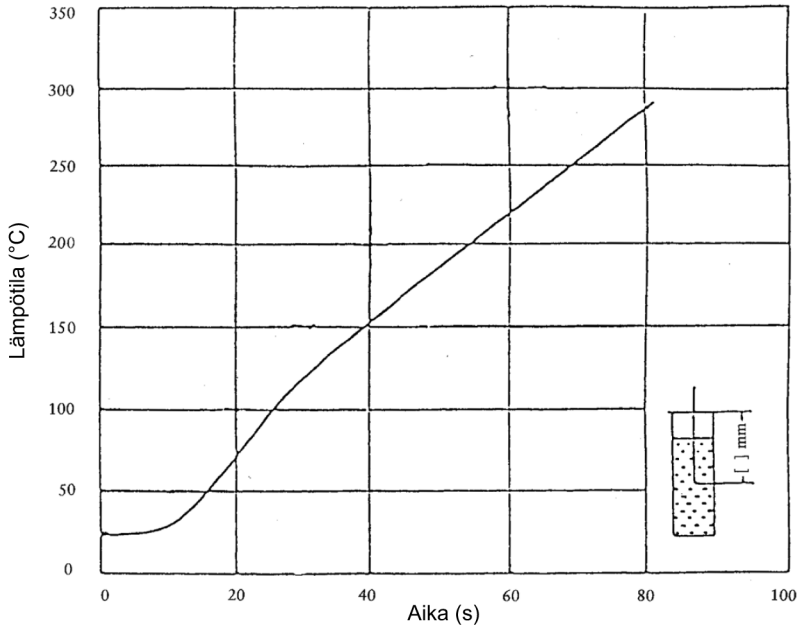
Lämpöherkkyystesti Esimerkkejä sirpaleenmuodostuksesta



▼B

Kuva 3

Kuumennusnopeuden kalibrointi lämpöherkkyystestiä varten



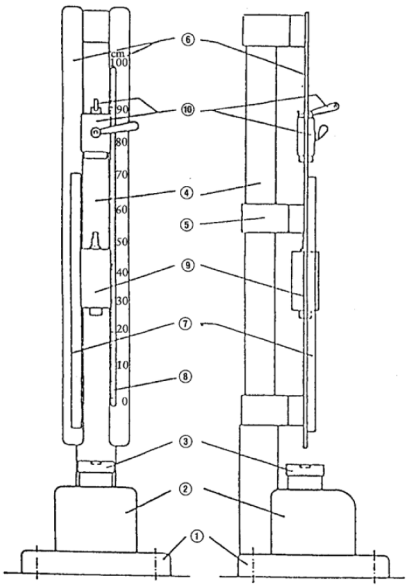
Lämpötila-aikakäyrä, joka on saatu kuumentamalla dibutyyliftalaattia (27 cm^3) suljetussa (1,5 mm:n mittauslaipalla varustetussa) putkessa käyttäen propaania ja virtausnopeutta 3,2 litraa minuutissa. Lämpötilan mittaukseen käytetään taipuisaa, ruostumattomasta teräksestä valmistettua kromi/alumiini-termoparia, jonka halkaisija on 1 mm ja joka on asetettu keskelle putkea 43 mmm etäisyydelle sen suusta. Alueella 135–285 °C kuumennusnopeuden on oltava välillä 185–215 K/min.

▼B

Kuva 4

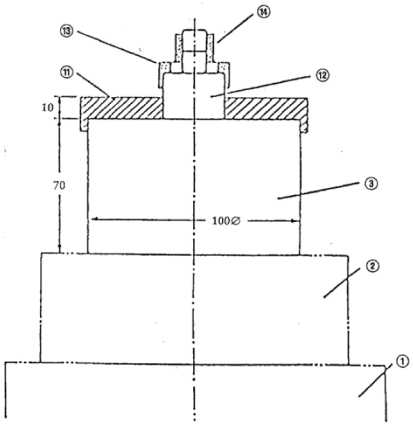
Iskutestilaite

(kaikki mitat ovat millimetreinä)



Kuva 4a Pudotusvasara sivulta ja edestä, yleisnäkymä

(1) alusta 450 x 450 x 60
(2) teräskappale, 230 x 250 x 200
(3) alasin, 100 (halkaisija) x 70
(4) pylväs
(5) poikkikannatin
(6) 2 ohjainta
(7) hammastettu tanko



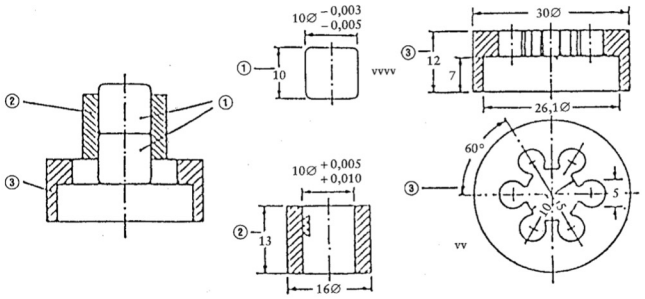
Kuva 4b Pudotusvasara, alaosa

(8) mitta-asteikko
(9) pudotusvasara (pudotusmassa)
(10) pito- ja irrotusosa
(11) kohdistuslaatta
(12) välialasin (vaihdettava), 26 halkaisija x 26
(13) aukoilla varustettu kohdistusrengas
(14) iskulaite

▼B

Kuva 4

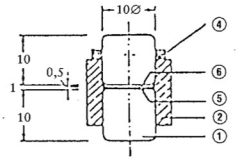
(Jatkuu)

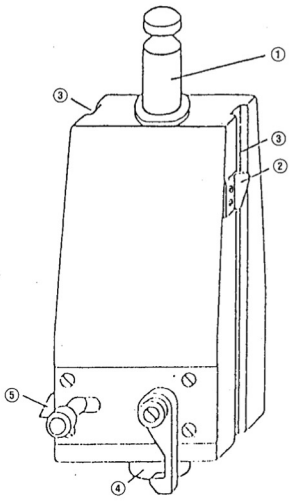


Kuva 4c Iskulaite jauhettuja tai pastamaisia aineita varten

Kuva 4d Iskulaite nestemäisiä aineita varten

1. terässylinterit
2. terässylintereiden ohjausrengas
3. aukoilla varustettu ohjausrengas
   (a) pystyleikkaus
   (b) pohjapiirros
4. kumirengas
5. nestemäinen aine (40 mm^3)
6. nesteetön tila





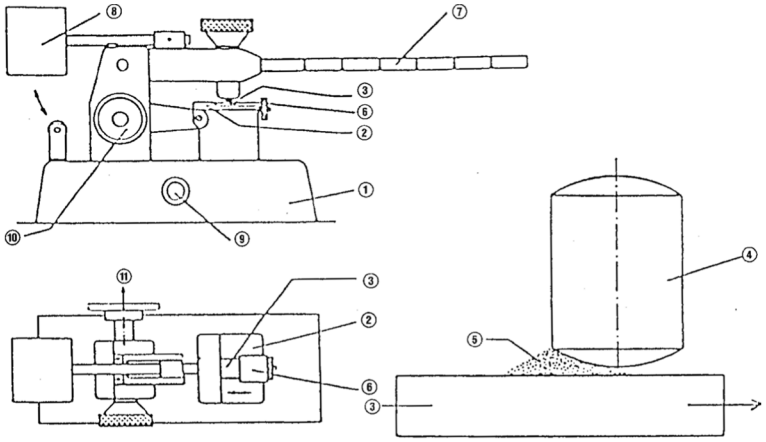
Kuva 4e Vasara (pudotusmassa: 5 kg)

1. jännitystappi
2. korkeusindikaatori
3. ohjausura
4. sylinterinmuotoinen iskupää
5. palautushaka

▼B

Kuva 5

Kitkaherkkyyslaite



Kuva 5a Kitkaherkkyyslaite, sivukuva ja pohjapiirros

1. teräsalusta
2. liikkuva vaunu
3. vaunulla oleva posliinilevy, 25 x 25 x 5 mm
4. kiinteä posliinitappi, 10 (halkaisija) x 15 mm
5. näyte, noin 10 mm^3

Kuva 5b Tapin alkuasento

6. tapinpidin
7. kuormitusvarsi
8. vastapaino
9. kytkin
10. pyörä, jolla vaunu asetetaan alkuasentoon
11. sähkömoottorin suunta

▼B

A.15 ITSESYTTYMISLÄMPÖTILA (NESTEET JA KAASUT)

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tätä testiä ei pidä käyttää räjähdysaineiden ja itsestään ilmassa tai huoneenlämmössä syttyvien aineiden kohdalla. Testiä voidaan soveltaa kaasuihin, nesteisiin tai höyryihin, jotka kosketuksissa ilmaan voivat syttyä kuuman pinnan vaikutuksesta.

Itsesyttymislämpötila laskee huomattavasti katalyyttisten epäpuhtauksien, pinta-aineen tai testausastian suuremman tilavuuden vaikutuksesta.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Itsesyttyvyysaste ilmaistaan itsesyttymislämpötilana. Itsesyttymislämpötila on alhaisin lämpötila, jossa näyte syttyy, kun se sekoitetaan ilmaan testimenetelmän määrittelemissä olosuhteissa.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineet mainitaan standardeissa (katso kohtaa 1.6.3). Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Menetelmällä määritetään suljetun astian sisäseinän alhaisin lämpötila, jossa astiaan ruiskutettu kaasu, höyry tai neste syttyy palamaan.

1.5 LAATUKRITEERIT

Toistettavuus vaihtelee itsesyttymislämpötila-alueiden ja käytetyn testimenetelmän mukaan.

Herkkyys ja spesifisyys vaihtelevat käytetyn testimenetelmän mukaan.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Laite**

Laite kuvataan kohdassa 1.6.3 mainituissa menetelmäkuvauksissa.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Näyte aineesta testataan kohdassa 1.6.3 mainitun menetelmäkuvauksen mukaan.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Katso standardeja IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B

2. **TIEDOT**

Pidetään kirjaa testilämpötilasta, ilmanpaineesta, käytetystä näytemäärästä ja syttymiseen kuluvasta ajasta.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— näyteaineen tarkat tiedot (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet),

— käytetty näytemäärä,

— ilmanpaine,

— käytetty laite,

— testitulokset (testilämpötilat, syttymistulokset ja viiveet),

— kaikki lisätiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4. **VIITTEET**

Viitteitä ei ole.

▼B

A.16 **KIINTEIDEN AINEIDEN SUHTEELLINEN ITSESYTTYMISLÄMPÖTILA**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Tätä testiä ei pidä käyttää räjähtävien aineiden ja itsestään ilmassa tai huoneenlämmössä syttyvien aineiden kohdalla. Testin avulla saadaan alustavaa tietoa kiinteiden aineiden itsesyttyvyydestä korkeissa lämpötiloissa.

Jos lämmön vapautuminen ympäristöön aineen reagoidessa hapen kanssa tai sen hajotessa eksotermisesti ei tapahdu tarpeeksi nopeasti, aineen kuumentaminen johtaa itsesyttymiseen. Näin ollen itsesyttyminen tapahtuu, kun lämmöntuotanto on nopeampaa kuin lämpöhäviö.

Testimenetelmä on käytännöllinen tapa saada alustavaa tietoa kiinteistä aineista. Koska kiinteiden aineiden syttyminen ja palaminen on monimutkainen tapahtuma, tällä menetelmällä määritettyjä itsesyttymislämpötiloja tulee käyttää vain vertailutarkoituksiin.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Tällä menetelmällä saatu itsesyttymislämpötila on alhaisin ympäristön lämpötila (°C), jossa tunnettu tilavuus näyteainetta syttyy tunnetuissa olosuhteissa.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Tunnettu määrä näyteainetta pannaan huoneenlämpöiseen uuniin. Uunin lämpötila nostetaan 0,5 °C:n minuuttinopeudella arvoon 400 °C (tai sulamispisteeseen, jos tämä on alhaisempi), ja näytteen keskustan lämpötila kirjataan ajan funktiona. Tämän testin itsesyttymislämpötilaksi katsotaan se uunin lämpötila, jossa näytteen lämpötila on itsestään kuumenemisen seurauksena saavuttanut arvon 400 °C.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Laite**

1.6.1.1 *Uuni*

Uuni on termostaatilla varustettu laboratoriouuni (tilavuus noin 2 litraa), jossa on luonnollinen ilmanvaihto ja räjähdysventtiili. Räjähdysvaaran välttämiseksi hajoamiskaasuja ei saa päästää kosketuksiin sähkölämmityselementtien kanssa.

▼B

1.6.1.2 *Lankaverkkokuutio*

Ruostumattomasta teräslangasta valmistetusta verkosta (0,045 mm aukko) leikataan kuvan 1 mukainen kuvio. Verkko taivutetaan ylhäältä avoimeksi kuutioksi ja kiinnitetään teräslangalla.

1.6.1.3 *Termoparit*

Käytetään sopivia termopareja.

1.6.1.4 *Rekisteröintilaite*

Mikä tahansa kaksikanavainen rekisteröintilaite, joka on kalibroitu 0–600 °C:lle tai vastaavalle jännitteelle.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Aineet testataan vastaanotetussa muodossa.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Verkkokuutioon pannaan näyteainetta, naputetaan kevyesti, ja lisätään ainetta, kunnes kuutio täyttyy. Tämän jälkeen kuutio ripustetaan huoneenlämpöisen uunin keskelle. Toinen termopari pannaan kuution keskustaan ja toinen kuution ja uunin seinän väliin mittaamaan uunin lämpötilaa.

Uunin lämpötila nostetaan 400 °C:seen (tai sulamispisteeseen, jos tämä on alhaisempi) 0,5 °C:n minuuttinopeudella. Uunin ja näytteen lämpötilaa rekisteröidään koko kuumennuksen ajan.

Kun aine syttyy, näytteessä olevan termoparin lämpötila nousee erittäin jyrkästi yli uunin lämpötilan.

2. **TIEDOT**

Arviointia varten käytetään sitä uunin lämpötilaa, jossa näytteen lämpötila on noussut 400 °C:seen itsesyttymisen vaikutuksesta (katso kuvaa 2).

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— näyteaineen tiedot,

— mittaustulokset lämpötila-aikakäyrineen,

— kaikki lisätiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

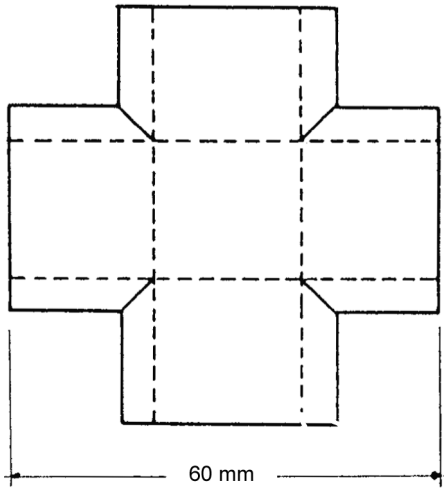
4. **VIITTEET**

(1) NF T 20-036 (September 85), Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

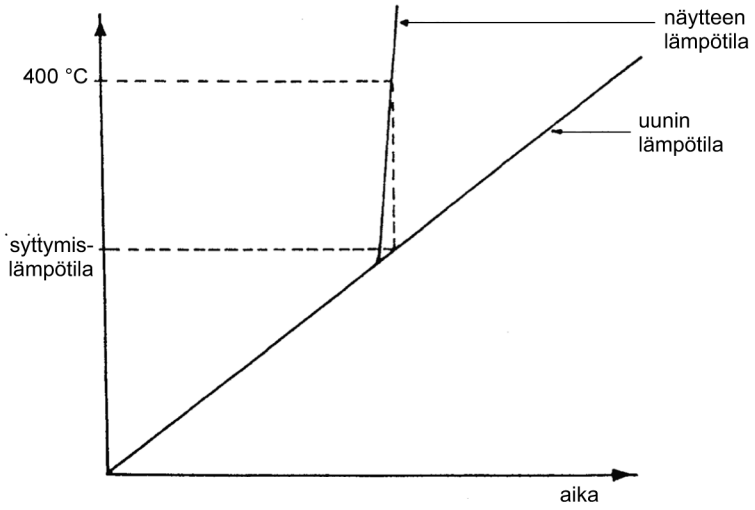
Kuva 1

20 mm:n näytekuution kaava



Kuva 2

Tyypillinen lämpötila-aikakäyrä



▼B

A.17 **HAPETTAVAT OMINAISUUDET (KIINTEÄT AINEET)**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ennen testiä on suositeltavaa hankkia alustavia tietoja aineen mahdollisista räjähdysominaisuuksista.

Menetelmää ei voi käyttää nesteiden, kaasujen, räjähdysalttiiden tai herkästi syttyvien aineiden tai orgaanisten peroksidien testaukseen.

Testiä ei tarvitse suorittaa, jos aineen rakennekaavasta voidaan täysin varmasti päätellä, että aine ei voi reagoida eksotermisesti syttyvien aineiden kanssa.

Alustavan testin avulla selvitetään, onko varsinaisessa testissä noudatettava erityistä varovaisuutta.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Palamisaika sekunteina on se aika, jossa reaktiovyöhyke kulkee keon läpi, kun käytetään kohdassa 1.6 kuvattua menetelmää.

Palamisnopeus ilmaistaan millimetreinä sekunnissa.

Suurin palamisnopeus on se palamisnopeuden suurin arvo, joka saadaan kun ainetta sekoitetaan hapettimeen eri pitoisuuksina (10–90 painoprosenttia hapetinta).

1.3 VERTAILUAINEET

Analyyttisen puhdasta bariumnitraattia voidaan käyttää testin ja alustavan testin vertailuaineena.

Vertailuseoksena käytetään sitä kohdan 1.6 mukaan valmistettua bariumnitraatin ja jauhetun selluloosan seosta, jolla on suurin palamisnopeus (yleensä seos. jossa on 60 painoprosettia bariumnitraattia).

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Turvallisuussyistä tehdään alustava testi. Jos alustavasta testistä selvästi ilmenee, että aineella on hapettavia ominaisuuksia, testiä ei tarvitse jatkaa. Muussa tapauksessa aine testataan kattavan testiohjelman mukaan.

Kattavassa testissä testattavaa ainetta ja määritettyä syttyvää ainetta sekoitetaan eri suhteissa. Jokaisesta seoksesta valmistetaan pitkänomainen keko, joka sytytetään toisesta päästä. Suurinta palamisnopeutta verrataan vertailuseoksen suurimpaan palamisnopeuteen.

1.5 LAATUKRITEERIT

Tarvittaessa voidaan käyttää mitä tahansa jauhamis- ja sekoitusmenetelmää, edellyttäen, että kuudesta erillisestä testistä saadut suurimmat palamisnopeudet poikkeavat aritmeettisesta keskiarvosta enintään 10 %.

▼B

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelutoimet**

1.6.1.1 *Näyte*

Näytteen hiukkaskoko pienennetään alle 0,125 mm:iin seuraavasti: näyte seulotaan, jäännös jauhetaan ja seulonta toistetaan. Tätä jatketaan, kunnes koko näytemäärä on läpäissyt seulan.

Jauhamiseen ja seulontaan voidaan käyttää mitä tahansa laatukriteerit täyttävää menetelmää.

Ennen seoksen valmistelua näytettä kuivataan 105 ºC:ssa, kunnes paino vakiintuu. Jos testattavan aineen hajoamislämpötila on alle 105 ºC, kuivaus on tehtävä sopivassa, alhaisemmassa lämpötilassa.

1.6.1.2 *Syttyvä aine*

Syttyvänä aineena käytetään jauhettua selluloosaa. Selluloosan on oltava ohutkerroskromatografiaan tai pylväskromatografiaan tarkoitettua tyyppiä. Selluloosatyyppi, jossa yli 85 % kuiduista on pituudeltaan 0,020–0,075 mm, on osoittautunut sopivaksi. Selluloosajauhe seulotaan 0,125 mm:n silmäkoon läpi. Testiin on käytettävä saman erän selluloosaa.

Jauhettua selluloosaa kuivataan ennen seoksen valmistelua 105 ºC:ssa, kunnes paino vakiintuu.

Jos alustavaan testiin käytetään puujauhoa, vaimistetaan havupuujauhe keräämällä talteen 1,6 mm:n seulan läpäissyt osa. Jauhe sekoitetaan huolellisesti ja sitä kuivataan 105 ºC:ssa neljä tuntia enintään 25 mm:n paksuisena kerroksena. Kuivauksen jälkeen puujauhe jäähdytetään ja pannaan ilmatiiviiseen säiliöön, joka pakataan mahdollisimman täyteen. Jauhe tulisi käyttää 24 tunnin kuluessa kuivauksesta.

1.6.1.3 *Sytytyslähde*

Sytytyslähteenä käytetään kaasupolttimen kuumaa liekkiä (minimihalkaisija 5 mm). Jos käytetään toista sytytyslähdettä (esimerkiksi kun testi tapahtuu inertissä ilmakehässä), on annettava tilanteen kuvaus ja perustelu.

1.6.2 **Testin suorittaminen**

Huomaulus:

Hapettimien ja selluloosan tai puujauheen seoksia on pidettävä räjähdysvaarallisina ja niitä on käsiteltävä varoen.

1.6.2.1 *Alustava testi*

Kuivattua näytettä ja kuivattua selluloosaa tai puujauhetta sekoitetaan huolella suhteessa 2 paino-osaa näytettä ja 1 paino-osa selluloosaa tai puujauhetta. Seos muotoillaan pieneksi kartionmuotoiseksi keoksi, jonka pohjan halkaisija on 3,5 cm ja korkeus 2,5 cm. Keko tehdään täyttämällä (ilman tiivistämistä) kartionmuotoinen muotti (esimerkiksi lasisuppilo, jonka varsi on suljettu).

▼B

Keko asetetaan kylmälle, palamattomalle ja ei-huokoiselle aluslevylle, jonka lämmönjohtavuus on heikko. Testi on suoritettava vetokaapissa (katso 1.6.2.2).

Kartiota kosketetaan sytytystähteellä. Sytytystä seuraavan reaktion voimakkuutta ja kestoa tarkkaillaan ja tulos kirjataan.

Jos reaktio on voimakas, ainetta pidetään hapettavana.

Jos tuloksen suhteen on epäilyjä, on tarpeen tehdä jäljempänä kuvattu kattava testi.

1.6.2.2 *Sarjatesti*

Valmistetaan hapettimen ja selluloosan seoksia, joissa hapettimen painoprosentti on 10–90 ja vaihteluväli 10 %. Rajatapauksissa on valmistettava seoksia, joilla on pienemmät vaihteluvälit, jotta suurin palamisnopeus voitaisiin määrittää mahdollisimman tarkasti.

Keko muotoillaan muotin avulla. Metallista valmistetun muotin pituus on 250 mm. Muotin kolmionmuotoisen läpileikkauksen sisäkorkeus on 10 mm ja leveys 20 mm. Muotin pituussuunnassa on molemmille sivuille kiinnitetty kaksi metallilevyä siten, että levyjen yläreuna on 2 mm muotin reunan yläpuolella (katso kuvaa). Lisätään seosta kevyelti hiukan muotin reunojen yli. Muotti pudotetaan kerran 2 cm korkeudelta kiinteälle pinnalle. Ylimääräinen aines kaavitaan pois, sivulevyt poistetaan ja muottiin jäävä aines tasoitetaan rullalla. Muotille asetetaan palamaton, ei-huokoisesta ja lämpöä heikosti johtavasta aineesta valmistettu aluslevy, laite käännetään ja muotti poistetaan.

Aseta näyte vetokaappiin.

Veto on säädettävä sellaiseksi, ettei savua pääse laboratoriotiloihin. Vedon voimakkuus ei saa vaihdella testin aikana. Laitteen ympärille pystytetään suojaseinä vetoa vastaan.

Koska selluloosa ja eräät testattavat aineet ovat hygroskooppisia, testi on suoritettava mahdollisimman nopeasti.

Keon toinen pää sytytetään koskettamalla sitä liekillä.

Kun reaktiovyöhyke on edennyt 30 mm, mitataan aika, joka kuluu seuraavan 200 mm:n etenemiseen.

Testi tehdään vertailuaineella ja vähintään kerran näyte-selluloosaseossarjan jokaisella osalla.

Jos todetaan, että näyteseoksen palamisnopeus on huomattavasti suurempi kuin vertailuseoksen palamisnopeus, testi voidaan keskeyttää. Muussa tapauksessa testi toistetaan viisi kertaa kolmelle nopeimmin palavalle seokselle.

▼B

Jos epäillään, että positiivinen tulos on virheellinen, testi toistetaan käyttäen selluloosan sijasta inerttiä ainetta, jolla on sama hiukkaskoko (esimerkiksi piimaata). Vaihtoehtoisesti nopeimmin palava näyte-selluloosaseos voidaan testata uudelleen inertissä ilmakehässä (< 2 tilavuusprosenttia happea).

2. **TIEDOT**

Turvallisuussyistä suurinta palamisnopeutta — ei keskiarvoa — pidetään näyteaineen tunnusomaisena hapettavana ominaisuutena.

Arviointia varten käytetään kuuden kokeen sarjan suurinta palamisnopeutta.

Laaditaan käyrä, johon jokaista seosta kohden merkitään suurin palamisnopeus hapettimen pitoisuuden funktiona. Tältä käyrältä luetaan suurin palamisnopeus.

Testattaessa suurimman palamisnopeuden omaava seos, testisarjan kuusi palamisnopeuden arvoa saavat poiketa aritmeettisesta keskiarvosta enintään 10 %. Muussa tapauksessa jauhamis- ja sekoitusmenetelmiä on parannettava.

Suurinta saatua palamisnopeutta verrataan vertailuseoksen palamisnopeuteen (katso 1.3).

Jos testit tehdään inertissä ilmakehässä, suurinta saatua reaktionopeutta verrataan inertissä ilmakehässä testatun vertailuaineen tulokseen.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— näyteaineen tunnistetiedot, koostumus, puhtausaste, kosteuspitoisuus jne.,

— näyteaineen mahdolliset käsittelyt (esimerkiksi jauhaminen ja kuivaus),

— testeissä käytetty sytytyslähde,

— mittaustulokset,

— havaitun reaktion luonne (esimerkiksi liekki näytteen pinnalla, palaminen koko massan läpi, tiedot palamistuotteista,...),

— kaikki lisätiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta mukaan lukien kuvaus reaktion voimakkuudesta (liekit, kipinät, savunmuodostus, kyteminen, jne.) ja likimääräinen kesto alustavan testin yhteydessä sekä näytteen että vertailuaineen osalta,

— tulokset inertin aineen testauksesta, jos tuloksia on käytettävissä,

— inertissä ilmakehässä tehtyjen testien tulokset, jos tuloksia on käytettävissä.

▼B

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Aineen katsotaan olevan hapettava seuraavissa tapauksissa:

a) jos alustavassa testissä tapahtuu voimakas reaktio;

b) jos seosten palamisnopeus kattavassa testissä on vähintään yhtä suuri kuin selluloosasta ja bariumnitraatista valmistetun vertailuseoksen suurin palamisnopeus.

Väärän positiivisen tuloksen välttämiseksi tulosten tulkinnassa on otettava huomioon myös tulokset, jotka on saatu testattaessa näytteen ja inertin aineen seosta tai suoritettaessa testiä inertissä ilmakehässä.

4. **VIITTEET**

(1) NF T 20-035 (SEPT 85), Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

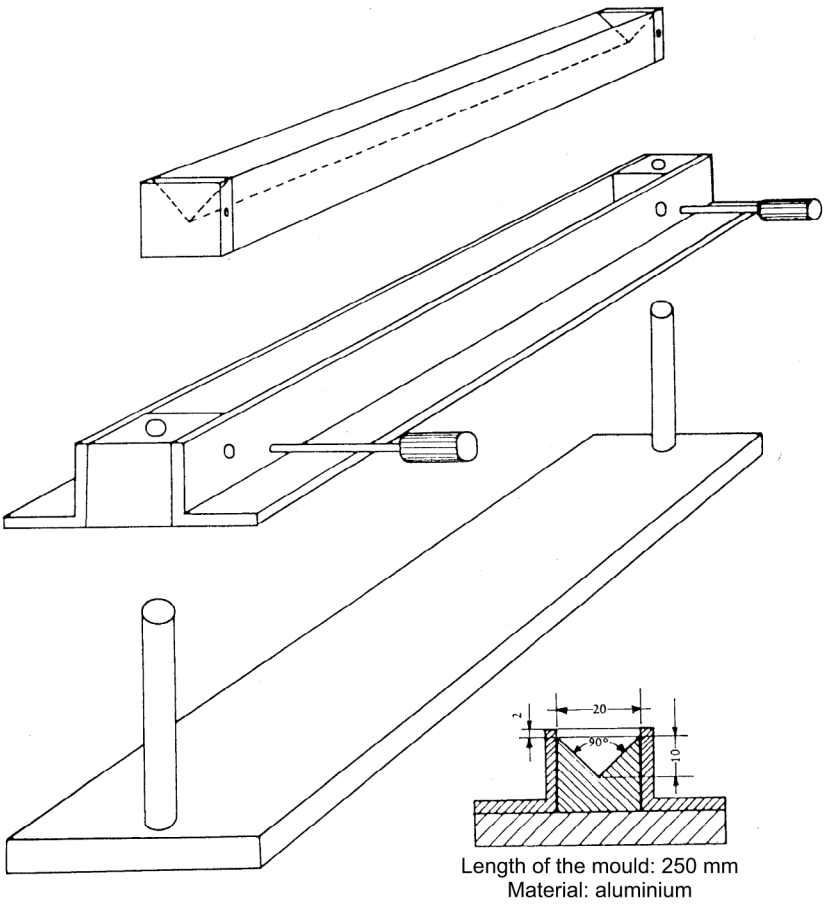
▼B

Liite

Kuva

Muotti ja tarvikkeet näytteen valmistelua varten

(Kaikki mitat ovat millimetreinä)



▼B

A.18. **POLYMEERIEN LUKUKESKIMÄÄRÄINEN MOLEKYYLIPAINO JA MOLEKYYLIPAINOJAKAUMA**

1. **MENETELMÄ**

Tämä geelipermeaatiokromatografiamenetelmä (GPC) on toisinto OECD:n testausohjeesta N:o 118 (1996). Menetelmän periaatteet ja teknisiä lisätietoja on viitteessä 1.

1.1 JOHDANTO

Koska polymeerien ominaisuudet ovat hyvin vaihtelevia, on mahdotonta antaa yhtä ainoaa menetelmää ja täsmällisiä erotus- ja arviointiohjeita, jotka sopisivat kaikkiin polymeerien erotuksessa mahdollisesti esiintyviin tapauksiin. Erityisesti monimutkaisia polymeeriseoksia voi olla mahdoton erottaa geelipermeaatiomenetelmällä. Jos GPO:tä ei voi käyttää, voidaan molekyylipaino määrittää muilla tavoilla (katso liite). Tällaisissa tapauksissa on käytetystä menetelmästä annettava yksityiskohtaiset tiedot ja perustelut on esitettävä.

Jäljempänä esitettävä menetelmä perustuu DIN-standardiin 55672 (1). Yksityiskohtaiset ohjeet kokeiden suorittamiseksi ja tulosten arvioimiseksi annetaan kyseisessä DIN-standardissa. Jos koeolosuhteita täytyy muuttaa, on muutokset perusteltava. Muita standardeja saa käyttää, jos niistä annetaan täydelliset viitteet. Tässä menetelmässä käytetään kalibrointiin polystyreeninäytteitä, johon sisältyvien polymeerien koot tunnetaan, ja menetelmää voi joutua muuttamaan, jotta sitä voitaisiin käyttää tietyille polymeereille, esim. vesiliukoisille ja pitkäketjuisille haaraantuville polymeereille.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Lukukeskimääräinen molekyylipaino M ja painokeskimääräinen molekyylipaino M_w määritetään seuraavilla yhtälöillä:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

joissa

H_i on detektorisignaalin korkeus perustasosta retentiotilavuudelle V_i,

M_i on retentiotilavuutta V_i vastaava polymeerifraktion molekyylipaino ja

n on mittauspisteiden lukumäärä.

Molekyylipainojakauman leveys, joka kuvastaa seoksen dispersiivisyyttä, saadaan suhteesta M_w/M_n.

▼B

1.3 VERTAILUAINEET

Koska GPC on suhteellinen menetelmä, on tehtävä kalibrointi. Tähän käytetään tavallisesti kokojakaumaltaan kapeita lineaarisia polystyreenistandardeja, joiden keskimääräiset molekyylipainot M_n ja M_w sekä molekyylipainojakauma tunnetaan. Kalibrointikäyrää voidaan käyttää tuntemattoman näytteen molekyylipainon määritykseen vain, jos näytteen ja standardin erotusolosuhteet on valittu samalla tavalla.

Molekyylipainon ja eluutiotilavuuden suhde on validi ainoastaan tietyn kokeen tietyissä koeolosuhteissa. Tärkeitä tekijöitä ovat ennen kaikkea lämpötila, liuotin (tai liuotinseos), kromatografiajärjestely sekä erotuspylväs tai pylväsjärjestelmä.

Tällä tavoin määritetyt näytteen molekyylipainot ovat suhteellisia arvoja ja niistä käytetään nimitystä ”polystyreeniekvivalenttimolekyylipaino”. Tämä tarkoittaa sitä, että riippuen näytteen ja standardien rakenne-eroista ja kemiallisista eroista molekyylipainot voivat poiketa absoluuttisista arvoista enemmän tai vähemmän. Jos käytetään muita standardeja, esim. polyetyleeniglykolia, polyetyleemoksidia, polymetyylimetakrylaattia tai polyakryylihappoa, on syy ilmoitettava.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Sekä näytteen molekyylipainojakauma että keskimääräiset molekyylipainot M_n ja M_w voidaan määrittää GPC:llä. GPC on erityinen nestekromatografian laji, jossa näytteen erottaminen perustuu seoksen yksittäisten aineiden hydrodynaamisiin tilavuuksiin (2).

Erottuminen tapahtuu, kun näyte kulkee huokoisella aineella, tyypillisesti orgaanisella geelillä täytetyn pylvään läpi. Pienet molekyylit tunkeutuvat huokosiin, kun taas suuret molekyylit jäävät huokosten ulkopuolelle. Isojen molekyylien kulkema tie on siten lyhyempi, ja ne tulevat ensimmäisenä ulos pylväästä. Keskikokoiset molekyylit tunkeutuvat joihinkin huokosiin ja eluoituvat myöhemmin. Pienimmät molekyylit, joiden keskimääräinen hydrodynaaminen säde on pienempi kuin geelin huokoset, voivat tunkeutua kaikkiin huokosiin. Ne eluoituvat viimeisinä.

Ihanteellisessa tilanteessa erottumiseen vaikuttaa ainoastaan molekyylilajin koko, mutta käytännössä on vaikea välttää ainakin jonkin verran adsorptiosta aiheutuvaa haittaa. Epätasaisesti pakattu pylväs ja kuolleet tilavuudet voivat pahentaa tilannetta (2).

Detektorina käytetään esim. taitekerroin- tai UV-detektoria, ja tuloksena saadaan yksinkertainen jakaumakäyrä. Jotta käyrästä voidaan lukea oikeita molekyylipainoja, on pylväs kalibroitava molekyylipainoltaan tunnetuilla polymeereillä, joilla on mieluiten suunnilleen samanlainen rakenne, esim. erilaiset polystyreenistandardit. Tuloksena on tyypillisesti Gaussin käyrä, joka on joskus vääristynyt siten, että pienen molekyylipainon puolella on ”häntä”; pystysuoralla akselilla on eluoitujen molekyylilajien määrät painomitoissa ja vaaka-akselilla molekyylipainon logaritmi.

▼B

1.5 LAATUKRITEERIT

Eluutiotilavuuden toistettavuuden (keskihajonnan keskivirhe: RSD) olisi oltava parempi kuin 0,3 %. Määrityksen vaadittu toistettavuus on varmistettava sisäistä standardia käyttämällä, jos kromatogrammin arviointi on aikariippuvainen eikä täytä edellä mainittuja kriteerejä (1). Polydispersiivisyys riippuu standardien molekyylipainoista. Polystyreenistandardien osalta tyypillisiä arvoja ovat:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 < M_p < 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p on standardin molekyylipaino piikin maksimissa)

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Polystyreenistandardiliuosten valmistus**

Polystyreenistandardit liuotetaan sekoittamalla huolellisesti haluttuun eluointiliuokseen. Valmistajan ohjeet on otettava huomioon liuosten valmistuksessa.

Valittujen standardien pitoisuudet riippuvat eri tekijöistä, esim. injektiotilavuudesta, liuoksen viskositeetistä ja detektorin herkkyydestä. Suurin injektiotilavuus on sovitettava pylvään pituuden mukaan, ettei pylvästä kuormiteta liikaa. Tyypilliset injektiotilavuudet käytettäessä GPC:tä analyyttisiin erotuksiin pylväässä, jonka koko on 30 cm x 7,8 mm, ovat tavallisesti 40–100 µl. Suuremmat tilavuudet ovat mahdollisia, mutta eivät saisi olla enemmän kuin 250 µl. Injektiotilavuuden ja aineen pitoisuuden paras suhde on määritettävä ennen pylvään varsinaista kalibrointia.

1.6.2 **Näyteliuoksen valmistus**

Periaatteessa samat vaatimukset koskevat näyteliuosten valmistamista. Näyte liuotetaan sopivaan liuottimeen (esim tetrahydrofuraaniin (THF)) ravistamalla huolellisesti. Sitä ei saa missään tapauksessa liuottaa ultraäänihauteessa. Tarpeen vaatiessa näyte puhdistetaan suodattamalla kalvolla, jonka huokoskoko on 0,2–2 µm.

Jos näytteessä on liukenemattomia hiukkasia, on tämä kirjattava loppuraporttiin, koska se saattaa johtua suurikokoisista molekyyleistä. Liukenemattomien hiukkasten painoprosenttiosuus on määritettävä jollakin sopivalla menetelmällä. Liuokset on käytettävä vuorokauden sisällä.

1.6.3 **Laitteisto**

— liuotinsäiliö

— kaasunpoistolaite (tarvittaessa)

— pumppu

▼B

— pulssinvaimennin (tarvittaessa)

— injektiojärjestelmä

— kromatografiapylväät

— ilmaisin (detektori)

— virtausmittari (tarvittaessa)

— tulosten tallennus/prosessointilaite

— jäteastia

On varmistettava, että GPC-laitteisto ei reagoi käytettävien liuottimien kanssa (esim. THF:n kanssa on käytettävä teräskapillaareja).

1.6.4 **Injektiojärjestelmä ja liuottimen annostelujärjestelmä**

Määrätty näytetilavuus syötetään pylvääseen joko automaattisella näytteensyöttölaitteella tai käsin tarkasti määriteltyyn vyöhykkeeseen, jos ruiskun mäntää vedetään tai työnnetään liian nopeasti, se voi aiheuttaa muutoksia havaitussa molekyylipainojakaumassa. Liuotinta pumppaavien pumppujen olisi oltava mahdollisimman tasaisia ja niissä saisi mieluiten olla pulssinvaimennin. Virtausnopeuden pitäisi olla noin 1 ml/min.

1.6.5 **Pylväs**

Näytteestä riippuen polymeerin ominaisuudet määritetään käyttäen joko yhtä pylvästä tai useita peräkkäin kytkettyjä pylväitä. Kaupallisesti on saatavilla lukuisia pylväsmateriaaleja, joiden ominaisuudet on määritelty (esim. huokoskoko, ekskluusiorajat). Erotusgeelin ja pylvään pituuden valinta riippuu sekä näytteen ominaisuuksista (hydrodynaamiset tilavuudet, molekyylipainojakauma) että erotuksen erityisvaatimuksista kuten liuottimesta, lämpötilasta ja virtausnopeudesta (1) (2) (3).

1.6.6 **Teoreettiset levyt**

Käytettävästä pylväästä tai pylväsyhdistelmästä on tiedettävä teoreettisten levyjen lukumäärä. Tätä varten syötetään pituudeltaan tunnettuun pylvääsen — jos THF on eluutioliuotin — etyylibentseeniliuosta tai muuta sopivaa ei-polaarista liuotinta. Teoreettisten levyjen lukumäärä saadaan seuraavasta yhtälöstä:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{tai} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

jossa

N on teoreettisten levyjen lukumäärä

V_e on eluutiotilavuus piikin maksimin kohdalla

▼B

W on piikin leveys perusviivalla

$W_{1/2}$ on piikin leveys piikin korkeuden puolivälissä.

1.6.7 **Erotusteho**

Teoreettisten levyjen lukumäärän lisäksi, joka on vyöhykkeen leveyden määräävä suure, myös erotusteholla on osansa. Erotustehon määrää kalibraatiokäyrän jyrkkyys. Pylvään erotusteho saadaan seuraavasta yhtälöstä:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{pylvään leikkausen pinta} - \text{ala}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

jossa

$V_{e,\,Mx}$ = on sellaisen polystyreenin, jonka molekyylipaino on M_x, eluutiotilavuus

$V_{e,(10Mx)}$ = on molekyylipainoltaan kymmenen kertaa suuremman polystyreenin eluutiotilavuus.

Järjestelmän erotuskyky määritellään yleensä seuraavasti:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

jossa

V_{el}, V_{e2} = ovat kahden polystyreenistandardin eluutiotilavuudet piikin maksimissa

W_1, W_2 = ovat piikin leveydet perusviivalla

M_l, M_2 = ovat molekyylipainot piikin maksimissa (niiden ero pitäisi olla vähintään 10-kertainen).

Pylvään R-arvon olisi oltava suurempi kuin 1,7 (4).

1.6.8 **Liuottimet**

Kaikkien liuottimien on oltava korkeaa puhtauslaatua (THF:n puhtaus 99,5 %). Liuotinastian (tarvittaessa inertissä kaasussa) on oltava riittävän iso pylvään kalibroimiseen ja useiden näytteiden määrittämiseen. Liuottimesta on poistettava kaasut ennen kuin sitä pumpataan pylvääseen.

1.6.9 **Lämpötilansäätö**

Tärkeiden laitteiston sisäisten osien (injektiosilmukka, pylväät, detektori ja letkut/putket) lämpötilan olisi oltava vakaa ja valitulle liuottimelle sopiva.

▼B

1.6.10 **Detektori**

Detektorin tarkoitus on mitata pylväästä tulevan näytteen pitoisuus. Jotta piikit eivät leviäisi tarpeettomasti, on detektorin mittauskyvetin tilavuuden oltava mahdollisimman pieni. Se ei saisi olla suurempi kuin 10 µl paitsi valon sirontaa tai viskositeettia mittaavilla detektoreilla. Detektorina käytetään tavallisesti differentiaalirefraktometriä. Muitakin detektoreja, esim. UV/VIS-, IR- ja viskositeettidetektoreja voidaan käyttää, mikäli näytteen tai eluutioliuottimen erityiset ominaisuudet edellyttävät sitä.

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Yksityiskohtaisten arviointiperusteiden samoin kuin määritystulosten keräämisen ja käsittelyn osalta on noudatettava DIN-standardin (1) määrityksiä.

Kustakin näytteestä tehdään kaksi erillistä koetta, jotka on analysoitava erikseen.

M_n, M_w, M_w/M_n ja M_p on ilmoitettava jokaisesta mittauksesta. On ilmoitettava selvästi, että mitatut arvot ovat suhteellisia arvoja, jotka ovat suhteessa käytettyjen standardien molekyylipainoihin.

Kun retentiotilavuudet tai retentioajat (mahdollisesti korjattuina sisäisten standardien suhteen) on määritetty, esitetään log M -arvot (M on kalibrointistandardin piikin korkein kohta) jonkin edellä mainitun suureen funktiona. Kutakin molekyylipainon kymmentä potenssia kohti tarvitaan vähintään kaksi kalibrointipistettä ja koko käyrällä on oltava vähintään viisi mittauspistettä, joiden pitäisi kattaa näytteen arvioitu molekyylipainoalue. Kalibrointikäyrän loppupiste pienen molekyylipainon päässä määritetään n-heksyylibentseenin tai jonkin muun sopivan ei-polaarisen liuottimen avulla M_n ja M_w määritetään tavallisesti tietokoneella osastossa 1.2 esitettyjen kaavojen perusteella. Jos käytetään manuaalista digitointia, voidaan ohjeeksi katsoa menetelmää ASTM D 3536-91 (3).

Jakaumakäyrä on esitettävä taulukon tai kuvan muodossa (differentiaalinen taajuus tai summaprosenttiosuudet log M:n funktiona). Graafisessa esityksessä yksi molekyylipainon kymmenen potenssi pitäisi olla tavallisesti noin 4 cm leveä ja piikin maksimin pitäisi olla noin 8 cm korkea. Koko jakaumakäyrän osalta y-akselin korkeuden 0 ja 100 %:n välillä olisi oltava noin 10 cm.

2.2 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat asiat:

2.2.1 **Testattava aine**

— saatavissa olevat tiedot testattavasta aineesta (tunnistetiedot, lisäaineet, epäpuhtaudet);

▼B

— näytteen käsittelyn kuvaus, mahdolliset huomiot ja ongelmat.

2.2.2 **Laitteisto**

— eluenttisäiliö, inertti kaasu, kaasun poisto eluentista, eluentin koostumus, epäpuhtaudet,

— pumppu, pulssinvaimennin, injektiojärjestelmä,

— erotuspylväät (valmistaja, kaikki tiedot pylväiden ominaisuuksista kuten huokoskoko, erotusmateriaalin tyyppi jne., käytettävien pylväiden lukumäärä, pituus ja järjestys),

— pylvään (tai pylväsyhdistelmän) teoreettisten levyjen lukumäärä, erotusteho (järjestelmän erotuskyky),

— piikkien symmetriaa koskevat tiedot,

— pylvään lämpötila, lämpötilan säätötapa,

— detektori (mittausperiaate, tyyppi, kyvetin tilavuus),

— mahdollinen virtausmittari (valmistaja, mittausperiaate),

— mittaustulosten tallennus- ja käsittelyjärjestelmä (laitteet ja ohjelmat).

2.2.3 **Järjestelmän kalibrointi**

— kalibrointikäyrän määrittämiseksi käytetyn menetelmän tarkka kuvaus

— tiedot menetelmän laatukriteereistä (esim. korrelaatiokerroin, jäännösneliösumma jne.)

— tiedot kaikista kokeen aikana sekä tulosten arvioinnissa ja käsittelyssä suoritetuista ekstrapolaatioista, oletuksista ja aproksimaatioista,

— kaikki kalibrointikäyrän määrittämiseksi käytetyt mittaukset on esitettävä taulukossa, jossa esitetään myös seuraavat tiedot kustakin kalibrointipisteestä:

  — näytteen nimi,

  — aineen valmistaja,

  — valmistajan ilmoittamat tai mittauksista johdetut standardien M_p, M_n, M_w ja M_w/M_n ominaisarvot sekä tarkat tiedot niiden määritysmenetelmästä,

  — injektiotilavuus ja injektoitavan liuoksen pitoisuus,

▼B

— kalibrointiin käytetty M_p-arvo

— eluutiotilavuus tai piikin maksimissa mitattu korjattu retentioaika,

— piikin maksimissa laskettu M_p

— laskemalla saadun M_p:n ja kalibrointiarvon prosenttivaihe.

2.2.4 **Arviointi**

— aikaperusteinen arviointi: toistettavuuden varmistamiseen käytetyt menetelmät (korjausmenetelmä, sisäinen standardi jne.),

— suoritetaanko arviointi eluutiotilavuuden vai retentioajan perusteella,

— tiedot arvion rajoituksista, jos piikkiä ei analysoida täydellisesti,

— mahdollisten tasoitusmenetelmien kuvaus,

— näytteen valmistus ja esikäsittely,

— mahdolliset liukenemattomat hiukkaset,

— injektiotilavuus (µl) ja injektoitavan näytteen pitoisuus (mg/ml),

— huomiot seikoista, joista aiheutuu poikkeamista ihanteellisesta GPC-käyttäytymisestä,

— tarkka kuvaus kaikista testausmeneteimien muutoksista,

— virherajoja koskevat yksityiskohtaiset tiedot,

— kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomiot.

3. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Liite

Esimerkkejä muista menetelmistä polymeerien lukukeskimääräisen molekyylipainon (M_n) määrittämiseksi

Geelipermeaatiokromatografia (GPC) on paras menetelmä M_n:n määrittämiseksi, erityisesti, jos on käytettävissä sarja standardeja, joiden rakenne vastaa polymeerin rakennetta. Jos kuitenkin GPC:n käytössä on käytännön hankaluuksia tai on odotettavissa, että aine ei täytä säädettyä M-kriteeriä (joka on varmistettava), voidaan käyttää muita menetelmiä, kuten

1. **Kolligatiivisten ominaisuuksien käyttö**

1.1 Ebullioskopia/kryoskopia

Tässä mitataan kiehumispisteen ylenemä (ebullioskopia) tai jäätymispisteen alenema (kryoskopia), kun liuokseen lisätään tutkittavaa polymeeriä. Menetelmä perustuu siihen, että liuenneen polymeerin vaikutus nesteen kiehumis/jäätymispisteeseen riippuu polymeerin molekyylipainosta (1) (2).

Soveltamisala: $M_n < 20\,000$.

1.2 Höyrynpaineen aleneminen

Tässä mitataan valitun vertailuaineen höyrynpaine ennen ja jälkeen, kun on lisätty tunnettu määrä polymeeriä (1) (2).

Soveltamisala: $M_{ri} < 20\,000$ (teoreettisesti; käytännössä tästä menetelmästä on vähän hyötyä).

1.3 Kalvo-osmometria

Tämä menetelmä perustuu osmoosiin, ts. liuotinmolekyylien luonnolliseen taipumukseen diffundoitua puoliläpäisevän kalvon läpi laimeasta väkevään liuokseen päin tasapainon saavuttamiseksi. Testin laimeassa liuoksessa ei ole lainkaan polymeeriä, ja väkevä liuos sisältää polymeeriä. Kun liuos menee kalvon läpi, muodostuu paine-ero, joka riippuu polymeerin konsentraatiosta ja molekyylipainosta (1) (3) (4).

Solveltamisala: $M_n < 20\,000$–$200\,000$.

1.4 Höyryfaasiosmometria

Tässä menetelmässä verrataan puhtaan liuotinaerosolin haihtumisnopeutta vähintään kolmeen aerosoliin, joissa polymeerin pitoisuus vaihtelee (1) (5) (6).

Soveltamisala: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Pääteryhmäanalyysi**

Jotta tätä menetelmää voitaisiin käyttää, on tunnettava sekä polymeerin koko rakenne että ketjujen päissä olevien ryhmien laatu (joka pitää voida olla erotettavissa päärakenteesta esim. NMR:llä tai titraamalla/derivatisoimalla). Kun määritetään polymeerissä olevien pääteryhmien molekulaarinen konsentraatio, voidaan johtaa arvo molekyylipainolle (7) (8) (9).

Soveltamisala: M_n korkeintaan 50 000 (luotettavuus vähenee molekyylipainon noustessa).

Kirjallisuusviitteet

(1) Billmeyer, F.W. Jr, (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn, John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed, Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989). Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25–52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E, Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139–2146.

▼B

A.19. **PIENIMOLEKYYLISTEN AINEIDEN PITOISUUS POLYMEERISSÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä geelipermeaatiokromatografiamenetelmä on toisinto OECD:n testausohjeesta N:o 119 (1996). Perusperiaatteet ja teknisiä lisätietoja saa kirjallisuusviitteistä.

1.1 JOHDANTO

Koska polymeerien ominaisuudet vaihtelevat suuresti, on mahdotonta kuvata yhtä ainoaa menetelmää, jossa selitettäisiin täsmällisesti kaikki polymeerien erotuksessa mahdollisesti esiintyvät erityiset seikat kattavat erotus- ja analysointiedellytykset. Erityisesti kompleksiset polymeerijärjestelmät eivät useinkaan sovi geelipermeaatiokromatografiaan. Kun GPC:tä ei voida käyttää, molekyylipaino voidaan määrittää muilla menetelmillä (katso Liite). Tällöin on esitettävä käytettyä menetelmää koskevat yksityiskohdat ja perustelut.

Seuraavassa kuvattava menetelmä perustuu DIN-standardiin 55672 (1). Tässä standardissa esitetään yksityiskohtaisesti, miten kokeet suoritetaan ja tulokset arvioidaan. Jos koeolosuhteita täytyy muuttaa, on muutokset perusteltava. Muita standardeja voi käyttää, jos niistä annetaan täydelliset viitteet. Tässä kuvattavassa menetelmässä käytetään tunnetun polydispersiivisyyden omaavia polystyreeninäytteitä kalibrointiin, ja menetelmää on mahdollisesti muutettava tiettyjä polymeerejä varten, esim. vesiliukoisia ja pitkäketjuisia haaraisia polymeerejä varten.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Matalaksi molekyylipainoksi määritellään pienempi kuin 1 000 (daltonia).

M_n (lukukeskimääräinen molekyylipaino) ja M_w (painokeskimääräinen molekyylipaino) määritellään seuraavilla yhtälöillä:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

joissa

H_1 = on detektorisignaalin korkeus perustasosta retentiotilavuudelle V_i,

M_j = on polymeerifraktion molekyylipaino retentiotilavuudessa V_i, ja n on mittauspisteiden lukumäärä.

Molekyylipainojakauman leveys, joka on suhteessa järjestelmän dispersiivisyyteen, saadaan suhteesta M_w/M_n

▼B

1.3 VERTAILUAINEET

Koska GPC on suhteellinen menetelmä, on tehtävä kalibrointi. Tähän käytetään tavallisesti kokojakaumaltaan kapeita lineaarisia polystyreenistandardeja, joiden keskimääräiset molekyylipainot M_n ja M_w sekä molekyylipainojakauma tunnetaan. Kalibrointikäyrää voidaan käyttää tuntemattoman näytteen molekyylipainon määritykseen vain, jos näytteen ja standardin erotusolosuhteet on valittu samalla tavalla.

Molekyylipainon ja eluutiotilavuuden suhde on validi ainoastaan tietyn kokeen tietyissä koeolosuhteissa. Tärkeitä tekijöitä ovat ennen kaikkea lämpötila, liuotin (tai liuotinseos), kromatografiajärjestely sekä erotus pylväs tai pylväsjärjestelmä.

Tällä tavoin määritetyt näytteen molekyylipainot ovat suhteellisia arvoja ja niistä käytetään nimitystä ”polystyreeniekvivalenttimolekyylipaino”. Tämä tarkoittaa sitä, että riippuen näytteen ja standardien rakenne-eroista ja kemiallisista eroista molekyylipainot voivat poiketa absoluuttisista arvoista enemmän tai vähemmän. Jos käytetään muita standardeja, esim. polyetyleeniglykolia, polyetyleenioksidia, poly-metyylimetakrylaattia tai polyakryylihappoa, on syy ilmoitettava.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Sekä näytteen molekyylipainojakauma että keskimääräiset molekyylipainot M_n ja M_w voidaan määrittää GPC:llä. GPC on erityinen nestekromatografian laji, jossa näytteen erottaminen perustuu seoksen yksittäisten aineiden hydrodynaamisiin tilavuuksiin (2).

Erottuminen tapahtuu, kun näyte kulkee huokoisella aineella, tyypillisesti orgaanisella geelillä täytetyn pylvään läpi. Pienet molekyylit tunkeutuvat huokosiin, kun taas suuret molekyylit jäävät huokosten ulkopuolelle. Isojen molekyylien kulkema tie on siten lyhyempi, ja ne tulevat ensimmäisenä ulos pylväästä. Keskikokoiset molekyylit tunkeutuvat joihinkin huokosiin ja eluoituvat myöhemmin. Pienimmät molekyylit, joiden keskimääräinen hydrodynaaminen säde on pienempi kuin geelin huokoset, voivat tunkeutua kaikkiin huokosiin. Ne eluoituvat viimeisinä.

Ihanteellisessa tilanteessa erottumiseen vaikuttaa ainoastaan molekyylilajin koko, mutta käytännössä on vaikea välttää ainakin jonkin verran adsorptiosta aiheutuvaa haittaa. Epätasaisesti pakattu pylväs ja kuolleet tilavuudet voivat pahentaa tilannetta (2).

Detektorina käytetään esim. taitekerroin- tai UV-detektoria, ja tuloksena saadaan yksinkertainen jakaumakäyrä. Jotta käyrästä voidaan lukea oikeita molekyylipainoja, on pylväs kalibroitava molekyylipainoltaan tunnetuilla polymeereillä, joilla on mieluiten suunnilleen samanlainen rakenne, esim. erilaiset polystyreenistandardit.

▼B

Tuloksena on tyypillisesti Gaussin käyrä, joka on joskus vääristynyt siten, että pienen molekyylipainon puolella on ”häntä”; pystysuoralla akselilla on eluoitujen molekyylilajien määrät painomitoissa ja vaaka-akselilla molekyylipainon logaritmi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Eluutiotilavuuden toistettavuuden (keskihajonnan keskivirhe: RSD) olisi oltava parempi kuin 0,3 %, Määritvksen vaadittu toistettavuus on varmistettava sisäistä standardia käyttämällä, jos kromato-grammin arviointi on aikariippuvainen eikä täytä edellä mainittuja kriteerejä (1). Polydispersiivisyys riippuu standardien molekyylipainoista. Polystyreenistandardien osalta tyypillisiä arvoja ovat:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p on standardin molekyylipaino piikin maksimissa).

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Polystyreenistandardiliuosten valmistus**

Polystyreenistandardit liuotetaan sekoittamalla huolellisesti haluttuun eluointiliuokseen. Valmistajan ohjeet on otettava huomioon liuosten valmistuksessa.

Valittujen standardien pitoisuudet riippuvat eri tekijöistä, esim. injektiotilavuudesta, liuoksen viskositeetistä ja detektorin herkkyydestä, Suurin injektiotilavuus on sovitettava pylvään pituuden mukaan, ettei pylvästä kuormiteta liikaa. Tyypilliset injektiotilavuudet käytettäessä GPC:tä analyyttisiin erotuksiin pylväässä, jonka koko on 30 cm x 7,8 mm, ovat tavallisesti 40–100 µl. Suuremmat tilavuudet ovat mahdollisia, mutta eivät saisi olla enemmän kuin 250 µl. Injektiotilavuuden ja aineen pitoisuuden paras suhde on määritettävä ennen pylvään varsinaista kalibrointia.

1.6.2 **Näyteliuoksen valmistus**

Periaatteessa samat vaatimukset koskevat näyteliuosten valmistamista. Näyte liuotetaan sopivaan liuottimeen (esim. tetrahydrofuraaniin (THF) ravistamalla huolellisesti. Sitä ei saa missään tapauksessa liuottaa ultraäänihauteessa. Tarpeen vaatiessa näyte puhdistetaan suodattamalla kalvolla, jonka huokoskoko on 0,2–2 µm.

Jos näytteessä on liukenemattomia hiukkasia, on tämä kirjattava loppuraporttiin, koska se saattaa johtua suurikokoisista molekyyleistä. Liukenemattomien hiukkasten painoprosenttiosuus on määritettävä jollakin sopivalla menetelmällä. Liuokset on käytettävä vuorokauden sisällä.

▼B

1.6.3 **Epäpuhtauksista ja lisäaineista johtuvat korjaukset**

Molekyylipainoltaan alle 1 000 olevien molekyylien suhteen on yleensä tehtävä korjaus, joka aiheutuu ei-polymeerisistä komponenteista (esim. epäpuhtaudet ja/tai lisäaineet), ellei pitoisuus jo ole pienempi kuin 1 %. Tämä tehdään analysoimalla suoraan polymeeriliuos tai GPC-eluaatti.

Jos eluaatti on pylväästä tultuaan liian laimea analysoitavaksi edelleen, se on konsentroitava. Voi olla tarpeen haihduttaa se kuiviin ja liuottaa uudelleen. Konsentroiminen on tehtävä siten, ettei eluaatissa tapahdu muutoksia. Eluaatin käsittely GPC-vaiheen jälkeen riippuu kvantitatiiviseen määritykseen käytettävästä analyyttisestä menetelmästä.

1.6.4 **Laitteisto**

GPC-laitteistoon kuuluu seuraavat osat:

— liuotinsäiliö

— kaasunpoistolaite (tarvittaessa)

— pumppu

— pulssinvaimennin (tarvittaessa)

— injektiojärjestelmä

— kromatografiapylväät

— ilmaisin (detektori)

— virtausmittari (tarvittaessa)

— tulosten tallennus/prosessointilaite

— jäteastia.

On varmistettava, että GPC-laitteisto ei reagoi käytettävien liuottimien kanssa (esim. THF:n kanssa on käytettävä teräskapillaareja).

1.6.5 **Injektiojärjestelmä ja liuottimen annostelujärjestelmä**

Määrätty näytetilavuus syötetään pylvääseen joko automaattisella näytteensyöttölaitteella tai käsin tarkasti määriteltyyn vyöhykkeeseen. Jos ruiskun mäntää vedetään tai työnnetään liian nopeasti, se voi aiheuttaa muutoksia havaitussa molekyylipainojakaumassa. Liuotinta pumppaavien pumppujen olisi oltava mahdollisimman tasaisia ja niissä saisi mieluiten olla pulssinvaimennin. Virtausnopeuden pitäisi olla noin 1 ml/min.

1.6.6 **Pylväs**

Näytteestä riippuen polymeerin ominaisuudet määritetään käyttäen joko yhtä pylvästä tai useita peräkkäin kytkettyjä pylväitä. Kaupallisesti on saatavilla lukuisia pylväsmateriaaleja, joiden ominaisuudet on määritelty (esim. huokoskoko, ekskluusiorajat). Erotusgeelin ja pylvään pituuden valinta riippuu sekä näytteen ominaisuuksista (hydrodynaamiset tilavuudet, molekyylipainojakauma) että erotuksen erityisvaatimuksista kuten liuottimesta, lämpötilasta ja virtausnopeudesta (1) (2) (3).

▼B

1.6.7 **Teoreettiset levyt**

Käytettävästä pylväästä tai pylväsyhdistelmästä on tiedettävä teoreettisten levyjen lukumäärä. Tätä varten syötetään pituudeltaan tunnettuun pylvääseen — jos THF on eluutioliuotin — etyylibentseeniliuosta tai muuta sopivaa ei-polaarista liuotinta. Teoreettisten levyjen lukumäärä saadaan seuraavasta yhtälöstä:

$$N = 5,54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{tai} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

jossa

N on teoreettisten levyjen lukumäärä

V_e on eluutiotilavuus piikin maksimin kohdalla

W on piikin leveys perusviivalla

W_{172} on piikin leveys piikin korkeuden puolivälissä.

1.6.8 **Erotusteho**

Teoreettisten levyjen lukumäärän lisäksi, joka on vyöhykkeen leveyden määräävä suure, myös erotusteholla on osansa. Erotustehon määrää kalibraatiokäyrän jyrkkyys. Pylvään erotusteho saadaan seuraavasta yhtälöstä:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{pylvään leikkausen pinta} - \text{ala}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

jossa

$V_{e,\,Mx}$ on sellaisen polystyreenin, jonka molekyylipaino on M_x, eluutiotilavuus

$V_{e,(10Mx)}$ on molekyylipainoltaan kymmenen kertaa suuremman polystyreenin eluutiotilavuus.

Järjestelmän erotuskyky määritellään yleensä seuraavasti:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

jossa

V_{e1}, V_{e2} ovat kahden polystyreenistandardin eluutiotilavuudet piikin maksimissa

W_1, W_2 ovat piikin leveydet perusviivalla

M_1, M_2, ovat molekyylipainot piikin maksimissa (niiden ero pitäisi olla vähintään 10-kertainen)

Pylvään R-arvon olisi oltava suurempi kuin 1,7 (4).

▼B

1.6.9 **Liuottimet**

Kaikkien liuottimien on oltava korkeaa puhtauslaatua (THF:n puhtaus 99,5 %). Liuotinastian (tarvittaessa inertissä kaasussa) on oltava riittävän iso pylvään kalibroimiseen ja useiden näytteiden määrittämiseen. Liuottimesta on poistettava kaasut ennen kuin sitä pumpataan pylvääseen.

1.6.10 **Lämpötilansäätö**

Tärkeiden laitteiston sisäisten osien (injektiosilmukka, pylväät, detektori ja letkut/putket) lämpötilan olisi oltava vakaa ja valitulle liuottimelle sopiva.

1.6.11 **Detektori**

Detektorin tarkoitus on mitata pylväästä tulevan näytteen pitoisuus. Jotta piikit eivät leviäisi tarpeettomasti, on detektorin mittauskyvetin tilavuuden oltava mahdollisimman pieni. Se ei saisi olla suurempi kuin 10 µl paitsi valon sirontaa tai viskositeettia mittaavilla detektoreilla. Detektorina käytetään tavallisesti differentiaalirefraktometriä. Muitakin detektoreja, esim. UV/VIS-, IR- ja viskositeettidetektoreja voidaan käyttää, mikäli näytteen tai eluutioliuottimen erityiset ominaisuudet edellyttävät sitä.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Yksityiskohtaisten arviointiperusteiden samoin kuin määritystulosten keräämisen ja käsittelyn osalta on noudatettava DIN-standardin (1) määrävksiä.

Kustakin näytteestä tehdään kaksi erillistä koetta, jotka on analysoitava erikseen.

M_n, M_w, M_w /M_n ja M on ilmoitettava jokaisesta mittauksesta. On ilmoitettava selvästi, että mitatut arvot ovat suhteellisia arvoja, jotka ovat suhteessa käytettyjen standardien molekyylipainoihin.

Kun retentiotilavuudet tai retentioajat (mahdollisesti korjattuina sisäisten standardien suhteen} on määritetty, esitetään log M -arvot (M_p on kalibrointistandardin piikin korkein kohta) jonkin edellä mainitun suureen funktiona. Kutakin molekyylipainon kymmenen potenssia kohti tarvitaan vähintään kaksi kalibrointipistettä ja koko käyrällä on oltava vähintään viisi mittauspistettä, joiden pitäisi kattaa näytteen arvioitu molekyylipainoalue. Kalibrointikäyrän loppupiste pienen molekyylipainon päässä määritetään n-heksyylibentseenin tai jonkin muun sopivan ei-polaarisen liuottimen avulla. M_n ja M_w määritetään tavallisesti tietokoneella osastossa 1.2 esitettyjen kaavojen perusteella. Jos käytetään manuaalista digitointia, voidaan ohjeeksi katsoa menetelmää ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Jakaumakäyrä on esitettävä taulukon tai kuvan muodossa (differentiaalinen taajuus tai summaprosenttiosuudet log M:n funktiona). Graafisessa esityksessä yksi molekyylipainon kymmenen potenssi pitäisi olla tavallisesti noin 4 cm leveä ja piikin maksimin pitäisi olla noin 8 cm korkea. Koko jakaumakäyrän osalta y-akselin korkeuden 0 ja 100 %:n välillä olisi oltava noin 10 cm.

2.2 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat asiat:

2.2.1 **Testattava aine**

— saatavissa olevat tiedot testattavasta aineesta (tunnistetiedot, lisäaineet, epäpuhtaudet),

— näytteen käsittelyn kuvaus, mahdolliset huomiot ja ongelmat.

2.2.2 **Laitteisto**

— eluenttisailiö, inertti kaasu, kaasun poisto eluentista, eluentin koostumus, epäpuhtaudet

— pumppu, pulssinvaimennin, injektiojärjestelmä

— erotuspylväät (valmistaja, kaikki tiedot pylväiden ominaisuuksista kuten huokoskoko, erotusmateriaalin tyyppi jne, käytettävien pylväiden lukumäärä, pituus ja järjestys),

— pylvään (tai pylväsyhdistelmän) teoreettisten levyjen lukumäärä, erotusteho (järjestelmän erotuskyky),

— piikkien symmetriaa koskevat tiedot,

— pylvään lämpötila, lämpötilan säätötapa,

— detektori (mittausperiaate, tyyppi, kyvetin tilavuus),

— mahdollinen virtausmittari (valmistaja, mittausperiaate),

— mittaustulosten tallennus- ja käsittelyjärjestelmä (laitteet ja ohjelmat).

2.2.3 **Järjestelmän kalibrointi**

— kalibrointikäyrän määrittämiseksi käytetyn menetelmän tarkka kuvaus,

▼B

— tiedot menetelmän laatukriteereistä (esim. korrelaatiokerroin, jäännösneliösumma jne.),

— tiedot kaikista kokeen aikana sekä tulosten arvioinnissa ja käsittelyssä suoritetuista ekstrapolaatioista, oletuksista ja aproksimaatioista,

— kaikki kalibrointikäyrän määrittämiseksi käytetyt mittaukset on esitettävä taulukossa, jossa esitetään myös seuraavat tiedot kustakin kalibrointipisteestä:

  — näytteen nimi,

  — aineen valmistaja,

  — valmistajan ilmoittamat tai mittauksista johdetut standardien M_p, M_n, M_w ja M_w/M_n ominaisarvot sekä tarkat tiedot niiden määritysmenetelmästä,

  — injektiotilavuus ja injektoitavan liuoksen pitoisuus,

  — kalibrointiin käytetty M_p-arvo,

  — eluutiotilavuus tai piikin maksimissa mitattu korjattu retentioaika,

  — piikin maksimissa laskettu M_p,

  — laskemalla saadun M_p:n ja kalibrointiarvon prosenttivaihe.

2.2.4 **Tiedot pienimolekyylipainoisen polymeerin pitoisuudesta**

— käytettyjen analyysimenetelmien kuvaus ja kokeiden suoritustapa,

— tiedot pienimolekyylipainoisen aineen pitoisuusprosentista (w/w) suhteessa koko näytteeseen,

— tiedot epäpuhtauksista, lisäaineista ja muista ei-polymeerisistä aineista painoprosentteina kokonäytteestä.

2.2.5 **Arviointi**

— aikaperusteinen arviointi: toistettavuuden varmistamiseen käytetyt menetelmät (korjausmenetelmä, sisäinen standardi jne.),

— suoritetaanko arviointi eluutiotilavuuden vai retentioajan perusteella,

— tiedot arvion rajoituksista, jos piikkiä ei analysoida täydellisesti,

— mahdollisten tasoitusmenetelmien kuvaus,

— näytteen valmistus ja esikäsittely,

— mahdolliset liukenemattomat hiukkaset,

▼B

— injektiotilavuus (µl) ja injektoitavan näytteen pitoisuus (mg/ml),

— huomiot seikoista, joista aiheutuu poikkeamista ihanteellisesta GPC-käyttäytymisestä,

— tarkka kuvaus kaikista testausmenetelmien muutoksista,

— virherajoja koskevat yksityiskohtaiset tiedot,

— kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomiot.

3. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

(1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J, and Bly, D.D. eds (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J.Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Liite

Ohjeet pienimolekyylipainoisten aineiden pitoisuuden korjaamiseksi, jos näytteessä on liukenematonta polymeeriä

Jos näytteessä on liukenematonta polymeeriä, aiheuttaa se massakatoa GPC-analyysissä. Liukenematon polymeeri tarttuu pylvääseen tai näytesuodattimeen, kun taas näytteen liukoinen osa menee pylvään läpi. Jos polymeerin taitekerroindifferentiaali (inkrementti) (dn/dc) voidaan arvioida tai mitata, voidaan arvioida pylvääseen hävinnyt näytemassa. Tällöin tehdään korjaus ulkoisella kalibroinnilla käyttäen standardiaineita, joiden konsentraatio ja dn/dc tunnetaan, refraktometrin vasteen kalibroimiseksi. Seuraavassa esimerkissä käytetään poly(metyylimetakrylaatti) (pMMA) -stardardia.

Akryylipolymeerianalyysin ulkoisessa kalibroinnissa analysoidaan tetrahydrofuraanissa oleva, tietyn konsentraatin omaava pMMA-standardi GPC:llä, ja tuloksien avulla määritetään refraktometrivakio seuraavalla yhtälöllä:

$$K = R/ (C \times V \times dn/dc),$$

jossa

K on refraktometrivakio (mikrovolttiasekunti/ml),

R on pMMA-standardin vaste (mikrovolttiasekunti),

C on pMMA-standardin konsentraatio (mg/ml),

V on injektiovolyymi (ml) ja

dn/dc on tetrahydrofuraanissa olevan pMMA-standardin taitekerroindifferentiaali (ml/mg).

Seuraavat tiedot ovat tyypillisiä pMMA-standardille:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

Tulokseksi saatua K-arvoa ($3{,}05 \times 10^{11}$) käytetään sitten teoreettisen detektorivasteen laskemiseksi, kun oletetaan, että injisoitu polymeeri eluoituu detektorist 100-prosenttisesti.

▼B

A.20. **VESILIUOKSESSA OLEVIEN POLYMEERIEN LIUKENEMIS/ UUTTUMISOMINAISUUDET**

1. **MENETELMÄ**

Seuraava menetelmä on toisinto OECD:n ohjeen N:o 120 (1997) muutetusta versiosta. Teknisiä lisätietoja on viitteessä (1).

1.1 JOHDANTO

Tietyille polymeereille, kuten emulsiopolymeerit, on tehtävä esikäsittelyjä ennen kuin seuraavassa selostettua menetelmää voi käyttää. Menetelmä ei sovellu nestemäisiin polymeereihin eikä veden kanssa testausolosuhteissa reagoiviin polymeereihin.

Jos menetelmä ei ole kohtuullisesti tai lainkaan mahdollinen, liukenemis/uuttumisominaisuuksia voi tutkia muilla menetelmillä. Tällöin on esitettävä käytetyn menetelmän yksityiskohdat ja perustelut.

1.2. VERTAILUAINEET

Ei vertailuaineita.

1.3. TESTAUSMENETELMÄN PERIAATE

Vesiliuoksessa olevien polymeerien liukenemis/uuttumisominaisuudet määritetään pullomenetelmällä (katso A.6. Vesiliukoisuus, pullomenetelmä) seuraavin muutoksin.

1.4 LAATUKRITEERIT

Ei laatukriteerejä.

1.5 TESTAUSMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1 **Laitteisto**

Menetelmässä tarvitaan seuraavat laitteet:

— murskauslaite, esim. jauhin, tietyn koon omaavien hiukkasten valmistamiseksi,

— ravistelulaite, jossa on lämpötilansäätö,

— kalvosuodatusjärjestelmä

— sopiva analyysilaitteisto

— standardisoidut seulat.

1.5.2 **Näytteen valmistus**

Edustava näyte on ensin saatettava hiukkaskokoon 0,125–0,25 mm sopivilla seuloilla. Näytteen stabiilisuuden varmistamiseksi tai jauhamisen aikana voidaan tarvita jäähdytystä. Kumimaisia aineita voi murskata neste typpilämpötilassa (1).

Jos vaadittua hiukkaskokoa ei voida saavuttaa, olisi pyrittävä saamaan hiukkaskoko mahdollisimman pieneksi, ja ilmoitettava tulos. Raportissa on selostettava, miten murskattua näytettä säilytettiin ennen testausta.

▼B

1.5.3 **Menetelmä**

Kolme 10 gramman näytettä testattavaa ainetta punnitaan kolmeen pulloon, joissa on lasitulpat, ja 1 000 ml vettä lisätään kuhunkin pulloon. Jos on hankala käsitellä 10:tä grammaa polymeeriä, käytetään suurempaa määrää ja lisätyn veden tilavuutta muutetaan vastaavasti.

Pullot suljetaan tiiviisti ja niitä ravistetaan 20 °C:ssa. Olisi käytettävä ravistelu- tai sekoituslaitetta, jonka lämpötila pysyy käytettäessä vakiona. Kunkin pullon sisältö sentrifugoidaan tai suodatetaan 24 tunnin kuluttua ja polymeerin pitoisuus kirkkaassa vesifaasissa määritetään sopivalla määritysmenetelmällä. Jos vesifaasille ei ole olemassa sopivaa määritysmenetelmää, kokonaisliukoisuus/uuttuvuus voidaan arvioida suodatusjäännöksen tai sentrifugoidun sakan kuivapainosta.

Tavallisesti on tehtävä kvantitatiivinen ero epäpuhtauksien ja lisäaineiden ja toisaalta pienimolekyylipainoisten aineiden välillä. Gravimetrisiä määrityksiä tehtäessä on tärkeää tehdä myös nollakoe ilman testattavaa ainetta, jotta voidaan määrittää koemenetelmästä johtuvat jäämät.

Polymeerien liukenemis/uuttumisominaisuuksia vedessä 37 °C:ssa pH:ssa 2 ja 9 voidaan määrittää samalla tavalla kuin 20 °C:n kokeessa. pH-arvot voidaan säätää lisäämällä joko sopivia puskureita tai sopivia happoja tai emäksiä kuten suolahappoa, etikkahappoa, pro analyysi -laatuista natrium- tai kaliumhydroksidia tai NH_3:a.

Määritysmenetelmästä riippuen on tehtävä yksi tai kaksi testiä. Jos on olemassa riittävän spesifinen menetelmä polymeerikomponentin määrittämiseksi suoraan vesiliuoksesta, pitäisi yhden edellä kuvatun kaltaisen testin riittää. Jos tällaista menetelmää ei kuitenkaan ole käytettävissä ja jos polymeerin liukenemis/uuttumisominaisuuksien määritys rajoittuu epäsuoraan analyysiin eli ainoastaan orgaanisen hiilen kokonaismäärän (TOC) määrittämiseen vesiuutteesta, pitäisi tehdä lisätesti. Tämä lisätesti pitäisi myös tehdä kolmoismäärityksenä käyttäen kymmenen kertaa pienempiä polymeerinäytteitä ja samaa määrää vettä kuin ensimmäisessä testissä.

1.5.4 **Määritys**

1.5.4.1 *Testi, jossa on yksi näytekoko*

Menetelmiä vesifaasissa olevan polymeerikomponentin suoraa määrittämistä varten voi olla olemassa. Vaihtoehtoisesti voidaan harkita myös liuenneiden/uuttuneiden polymeerikomponenttien epäsuoraa analyysiä, jolloin määritetään liukoisten osien kokonaispitoisuus ja korjataan ei-polymeerispesifisten komponenttien suhteen.

Kokonaispolymeeri voidaan määrittää vesiliuoksesta:

joko riittävän herkällä menetelmällä, esim.

— TOC käyttämällä persulfaatti- tai dikromaattidigestiota, jolloin muodostuva CO_2 määritetään IR:llä tai kemiallisesti;

▼B

— atomiabsorptiospektrometrialla (AAS) tai ICP (inductively coupled plasma) -emissiomenetelmällä, jos polymeeri sisältää piitä tai metallia;

— UV-absorptio- tai spektrofluorometrialla, jos on kyseessä aryylipolymeeri;

— LC-MS:llä, jos on kyseessä pienimolekyylipainoiset näytteet;

tai haihduttamalla vesiuute tyhjiössä kuiviin ja tekemällä jäännöksestä spektroskooppinen (IR, UV jne.) tai AAS/ICP-analyysi.

Jos vesifaasia ei voida sellaisenaan analysoida, pitäisi vesiuute uuttaa veteen sekoittuvalla orgaanisella liuottimella, esim. klooratulla hiilivedyllä. Liuotin haihdutetaan ja jäännöksestä määritetään ilmoitetun polymeerin pitoisuus kuten edellä on selostettu. Jos tässä jäännöksessä tunnistetaan epäpuhtauksia tai lisäaineita, on niiden osuus vähennettävä itse polymeerin liukenemis/uuttumisasteen määrittämiseksi.

Jos näytteessä on suhteellisen paljon tällaisia aineita, voi olla tarpeen tehdä jäännökselle esim. HPLC-tai GC-analyysi epäpuhtauksien erottamiseksi monomeeristä ja monomeeristä peräisin olevasta aineesta, jotta monomeerin todellinen pitoisuus voidaan määrittää.

Joskus voi riittää, että orgaaninen liuotin haihdutetaan kuiviin ja kuiva jäännös punnitaan.

1.5.4.2 *Testi, jossa on kaksi eri näytekokoa*

Kaikista vesiuutteista määritetään TOC.

Näytteen liukenemattomalle osalle (joka ei uuttunut) tehdään gravimetrinen analyysi. Jos kunkin pullon sisällön sentrifugoinnin tai suodattamisen jälkeen polymeerijäännöksiä on tarttunut pullon seinämiin, pitäisi pullo huuhtoa suodoksella, kunnes siinä ei enää näy mitään jäännöstä. Sen jälkeen suodos sentrifugoidaan tai suodatetaan uudelleen. Suodattimeen tai sentrifuugiputkeen jäänyt jäännös kuivataan 40 °C:ssa tyhjiössä ja punnitaan. Kuivaamista jatketaan, kunnes saavutetaan vakiopaino.

2. MÄÄRITYSTULOKSET

2.1 TESTI, JOSSA ON YKSI NÄYTEKOKO

Ilmoitetaan erilliset tulokset kutakin kolmea pulloa kohti ja keskiarvot ilmaistuna massayksiköllä liuostilavuutta kohti (tyypillisesti mg/l) tai massayksiköllä polymeerinäytteen massaa kohti (tyypillisesti mg/g). Lisäksi pitäisi ilmoittaa näytteen painohävikki (liuenneen aineen paino jaettuna alkuperäisen näytteen painolla) Suhteelliset keskihajonnat (RSD) pitäisi laskea. Tulokset pitää antaa koko ainemäärää kohti (polymeeri + olennaiset lisäaineet jne.) ja pelkkää polymeeriä kohti (ts. sen jälkeen, kun on vähennetty tällaisten lisäaineiden vaikutus).

▼B

2.2 TESTI, JOSSA ON KAKSI NÄYTEKOKOA

Ilmoitetaan erilliset TOC-arvot kahden kolmenkertaisilla näytteillä tehdyn kokeen vesiliuosuutteille ja kunkin kokeen keskiarvo ilmaistuna massayksiköllä liuostilavuutta kohti (tyypillisesti mgC/l) sekä massayksikköinä alkuperäisen näytteen painoa kohti (tyypillisesti mgC/g).

Jos tuloksissa ei ole eroa, kun näytteen suhde vesimäärään on suuri tai pieni, tämä voi merkitä sitä, että kaikki uuttuvat komponentit ovat todella uuttuneet. Tällöin ei suora määritys ole yleensä tarpeen.

Kunkin jäännöksen painot olisi ilmoitettava erikseen ja ilmaistava prosentteina näytteiden alkuperäispainoista. Keskiarvot lasketaan koetta kohti. Erotus sadan prosentin ja havaittujen prosenttimäärien välillä on alkuperäisen näytteen liukoisen ja uuttuvan aineksen prosenttimäärä.

3. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

3.1.1 **Testattava aine:**

— saatavissa olevat tiedot testattavasta aineesta (tunnistetiedot, lisäaineet, epäpuhtaudet, pienimolekyylipainoisen aineen pitoisuus)

3.1.2 **Koeolosuhteet**

— kuvaus käytetyistä menetelmistä ja koeolosuhteista;

— kuvaus analyyttisistä ja detektiomenetelmistä.

3.1.3 **Tulokset:**

— liukoisuus/uuttuvuustulokset mg/l; yksittäiset arvot ja keskiarvot uuttumiskokeista eri liuoksissa, eritellen polymeeripitoisuus ja epäpuhtaudet, lisäaineet ym.,

— liukoisuus/uuttuvuustulokset mg/g polymeeriä,

— vesiliuosuutteiden TOC-arvot, liuenneen aineen paino ja lasketut prosenttiosuudet, jos ne on mitattu,

— kunkin näytteen pH,

— tiedot nollanäytteistä,

— tarvittaessa kirjallisuudesta saatavat tiedot testattavan aineen kemiallisesta epästabiilisuudesta sekä testausprosessin aikana että analyysin aikana,

— muut tiedot, jotka ovat tärkeitä tulosten tulkitsemisen kannalta.

4. KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. **HAPETTAVAT OMINAISUUDET (NESTEET)**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Tämän testimenetelmän tarkoituksena on mitata nestemäisen aineen kyky suurentaa palavan aineen palamisnopeutta tai -intensiteettiä tai sen kykyä muodostaa palavan aineen kanssa sellainen seos, joka voi syttyä itsestään, kun aineet sekoitetaan täydellisesti. Menetelmä perustuu YK:n testiin hapettaville nesteille (1) ja vastaa sitä täysin. Koska menetelmä A.21 on kuitenkin tarkoitettu pääasiassa täyttämään asetuksen 1907/2006 vaatimukset, testattavaa ainetta on tarpeen verrata vain yhteen vertailuaineeseen. Testaaminen ja aineen vertaaminen muihin vertailuaineisiin voi olla tarpeen, jos on odotettavissa, että testien tuloksia käytetään muihin tarkoituksiin ([1]).

Tätä testiä ei tarvitse tehdä, jos rakennekaavaa tarkastelemalla voidaan päätellä kohtuullisella varmuudella, että aine ei voi reagoida eksotermisesti palavan aineen kanssa.

On hyvä, jos aineen mahdollisista räjähdysominaisuuksista on saatavilla alustavaa tietoa ennen testin tekemistä.

Tätä testi ei sovellu kiinteille aineille, kaasuille, räjähtäville tai erittäin helposti syttyville aineille eikä orgaanisille peroksideille.

Tätä testiä ei mahdollisesti tarvitse tehdä, jos ainetta koskevia tuloksia on jo olemassa YK:n hapettavia nesteitä koskevasta testistä (1).

1.2 MÄÄRITELMÄT JA MITTAYKSIKÖT

Keskimääräinen paineennousuaika on niiden aikojen keskiarvo, jotka on mitattu, kun testattavan seoksen paine on nostettu 690 kPa:sta 2 070 kPa:an ilmanpaineen yläpuolella.

1.3 VERTAILUAINE

Vertailuaineeksi tarvitaan 65-painoprosenttista typpihappoa (vesiliuos; analyyttinen laatu) ([2]).

([1]) Esimerkiksi YK:n kuljetussäännösten yhteydessä.
([2]) Happo on titrattava ennen testausta sen konsentraation varmistamiseksi.

▼B

Jos kokeen tekijä kuitenkin arvelee, että testin tuloksia saatetaan käyttää muihin tarkoituksiin ([1]), muidenkin vertailuaineiden testaaminen voi olla aiheellista ([2]).

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testattava neste sekoitetaan massasuhteessa 1:1 kuituselluloosan kanssa ja siirretään paineastiaan. Jos aineet syttyvät itsestään sekoitettaessa tai astiaa täytettäessä, ei testiä tarvitse jatkaa.

Jos testattava seos ei syty itsestään, tehdään koko testi. Seosta kuumennetaan paineastiassa ja määritetään keskimääräinen aika, joka tarvitaan, että paine nousee 690 kPa:sta 2 070 kPa:an ilmanpaineen yläpuolella. Tätä verrataan siihen keskimääräiseen aikaan, joka tarvitaan, että vertailuaine(id)en ja selluloosan 1:1-seos paine nousee saman verran.

1.5 LAATUKRITEERIT

Viiden kokeen sarjassa yhdellä aineella mikään tulos ei saa erota enempää kuin 30 % aritmeettisesta keskiarvosta. Tulokset, jotka eroavat yli 30 % keskiarvosta, on hylättävä, sekoitus- ja täyttömenetelmää on parannettava ja testi uusittava.

1.6 MENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Valmistelu**

1.6.1.1 *Palava aine*

Palavana aineena käytetään kuivattua kuituselluloosaa, jonka kuidun pituus 50–250 μm ja keskihalkaisuja 25 μm ([3]). Selluloosa kuivataan vakiopainoon kerroksena, joka on enintään 25 mm paksu, 105 °C:ssa 4 tuntia, ja sitä pidetään eksikkaattorissa kuivatusaineen kanssa, kunnes se on jäähtynyt ja kunnes sitä tarvitaan. Kuivatun selluloosan vesipitoisuuden pitäisi olla alle 0,5 % kuivasta massasta ([4]). Tarvittaessa kuivatusaikaa on pidennettävä, jotta tähän päästään ([5]). Koko testin aikana on käytettävä samaa selluloosaerää.

([1]) Esimerkiksi YK:n kuljetussäännösten yhteydessä.
([2]) Esimerkiksi 50-painoprosenttista perkloorihappoa ja 40-painoprosenttista natriumkloraattia on käytetty viitteessä 1.
([3]) Esimerkiksi Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, luettelon nro 4021 050.
([4]) Varmistetaan (esim.) Karl-Fisherin titrauksella.
([5]) Vesipitoisuus voidaan määrittää myös (esim.) kuumentamalla 105 °C:ssa tyhjiössä 24 h.

▼B

1.6.1.2 *Laitteet*

1.6.1.2.1 P a i n e a s t i a

Testiin tarvitaan lieriönmuotoinen teräksinen paineastia, jonka pituus on 89 mm ja ulkohalkaisija 60 mm (ks. kuva 1). Vastakkaisille sivuille työstetään kaksi tasaista pintaa (jolloin astian poikkileikkaus pienenee 50 mm:iin) kiinnipitämisen helpottamiseksi, kun sytytystulppaa ja ilmaustulppaa pannaan paikoilleen. Astian sisäläpimitta on 20 mm ja kummankin pään sisäpuoli on kyntetty 19 mm:n syvyydeltä ja siinä on kierteet, joihin sopii 1" British Standard Pipe (BSP) tai vastaava metrijärjestelmän mukainen osa. Paineastian pyöreään pintaan 35 mm:n päähän astian toisesta päästä ja 90 asteen kulmassa työstettyihin pintoihin on ruuvattu sivuhaara, jonka kautta paine voidaan päästää ulos. Sivuhaaraputken istukka porataan 12 mm:n syvyyteen siten, että siihen sopii 1/2":n BSP (tai metrijärjestelmän vastaava) kierre sivuhaaran päässä. Tarvittaessa lisätään inertti tiiviste, jotta liitos on kaasutiivis. Sivuhaara ulottuu 55 mm:n päähän paineastian ulkopuolelle, ja sen sisäläpimitta on 6 mm. Sivuhaaran pää on kyntetty ja sen kierteet ovat sellaiset, että niihin sopii kalvotyyppinen paineenmuunnin. Mitä tahansa paineenmittauslaitetta voidaan käyttää edellyttäen, etteivät kuumat kaasut tai hajoamisessa syntyvät yhdisteet vaikuta siihen ja että se pystyy mittaamaan paineennousunopeuksia 690–2 070 kPa:n välillä alle 5 ms:ssa.

Kauempana sivuhaarasta oleva paineastian pää suljetaan sytytystulpalla, jossa on kaksi elektrodia. Toinen niistä on eristetty tulpan pääosasta ja toinen on maadoitettu siihen. Paineastian toisessa päässä on varokalvo (murtumispaine noin 2 200 kPa), jota pitää paikallaan sisäläpimitaltaan 20 mm:n tulppa. Tarvittaessa sytytystulpan kanssa käytetään inerttiä tiivistettä, jotta liitos on kaasutiivis. Tukiteline (kuva 2) pitää kokoonpanon oikeassa asennossa käytön aikana. Siihen kuuluu tavallisesti pehmeää terästä oleva pohjalaatta, jonka mitat ovat 235 mm x 184 mm x 6 mm, ja 185 mm:n pituinen poikkileikkaukseltaan neliönmuotoinen onttotanko, jonka mitat ovat 70 mm x 70 mm x 4 mm.

Neliöonttotangon toisessa päässä siitä leikataan pala vastakkaisilta puolilta siten, että saadaan rakenne, jossa on kaksi litteäreunaista jalkaa, joiden yläpuolella on 86 mm koskematonta neliöonttotankoa. Jalat leikataan siten, että ne muodostavat 60°:n kulman vaakatason kanssa, kun tanko on hitsattu pohjalaattaan. Pohjarakenteen yläosan yhdelle laidalle työstetään lovi, jonka leveys on 22 mm ja syvyys 46 mm, siten, että kun paineastiakokoonpano lasketaan onttotankotelineeseen sytytystulppa edellä, sivuhaara sopii loveen. Onttotangon alempaan sisäpintaan hitsataan 30 mm leveä ja 6 mm paksu teräspala, joka toimii välikkeenä. Kaksi vastakkaisilla pinnoilla olevaa 7 mm:n siipiruuvia pitää paineastian tukevasti paikallaan. Kaksi 12 mm leveää 6 mm:n paksuisesta teräksestä tehtyä nauhaa, jotka on hitsattu onttotangon pohjaosaan kiinnittyviin sivuosiin, tukee paineastiaa alhaalta päin.

▼B

1.6.1.2.2 Sytytysjärjestelmä

Sytytysjärjestelmä koostuu 25 cm pitkästä Ni/Cr-langasta, jonka halkaisija on 0,6 mm ja vastus 3,85 ohm/m. Lanka on kierretty halkaisijaltaan 5 mm:n tangon avulla kelaksi ja kiinnitetty sytytystulpan elektrodeihin. Kelan muodon pitäisi olla sellainen kuin kuvassa 3 esitetään. Astian pohjan ja sytytyskelan alapään välisen etäisyyden pitäisi olla 20 mm. Ellei elektrodeja voi säätää, pitäisi kelan ja astian pohjan välillä olevan sytytyslangan päät eristää keraamivaipalla. Lankaa kuumennetaan tasavirtatehonlähteellä, joka pystyy tuottamaan vähintään 10 A:n voimakkuista virtaa.

1.6.2 **Testin suoritusarvot** ([1])

Laitetta, joka on koottu täydellisesti ja jossa on paineenmuunnin ja kuumennusjärjestelmä, mutta johon ei ole asennettu varokalvoa, tuetaan sytytystulppapuoli alaspäin. 2,5 g testattavaa nestettä ja 2,5 g kuivattua selluloosaa sekoitetaan lasidekanterissa käyttäen lasista sekoitussauvaa ([2]). Turvallisuussyistä työntekijän ja seoksen välillä on oltava suojalevy sekoituksen aikana. Jos seos syttyy sekoituksen tai täytön aikana, ei testiä tarvitse jatkaa. Seos siirretään paineastiaan pieni määrä kerrallaan taputtaen, jotta seos pakkautuisi sytytyskelan ympärille ja olisi hyvin kosketuksissa sen kanssa. On tärkeää, ettei kela vääristy seoksen pakkaamisen aikana, koska se voisi aiheuttaa vääriä tuloksia ([3]). Varokalvo asetetaan paikalleen ja kiinnitystulppa kierretään tiukasti paikalleen. Täytetty astia asetetaan tukitelineeseen siten, että varokalvo on ylöspäin. Teline olisi sijoitettava sopivaan vahvistettuun vetokaappiin tai sytytyskammioon. Tehonlähde yhdistetään sytytystulpan ulompiin päihin ja annetaan 10 A:n virtaa. Aika, joka kuluu sekoituksen aloittamisesta tehon kytkemiseen, ei saisi olla pitempi kuin 10 min.

Paineenmuuntimen aikaansaama signaali rekisteröidään sopivalla järjestelmällä, joka mahdollistaa sekä arvioinnin että saadun aika-painekäyrän pysyvän rekisteröinnin (esim. transienttitallennin, joka on kytketty piirturiin). Seosta kuumennetaan, kunnes varokalvo murtuu tai ainakin 60 s. Jos varokalvo ei murru, seoksen on annettava jäähtyä ennen kuin laite puretaan varovasti ja varoen erityisesti mahdollista paineen vapautumista. Testattavalla aineella ja vertailuaineella (-aineilla) tehdään viisi koetta. Kirjataan aika, joka kuluu siihen, että paine nousee 690 kPa:sta 2 070 kPa:iin ilmanpaineen yläpuolella. Lasketaan paineennousuun kuluvien aikojen keskiarvo.

Joissakin tapauksissa aineet saattavat aiheuttaa paineen nousun (liian suuren tai liian pienen), joka aiheutuu sellaisista kemiallisista reaktioista, jotka eivät liity aineen hapettaviin ominaisuuksiin. Tällöin voi olla tarpeen toistaa testi inertillä aineella, esim. piimaalla (kieselguhr), selluloosan sijasta reaktion laadun selvittämiseksi.

([1]) Hapettimien ja selluloosan seoksia on pidettävä mahdollisesti räjähtävinä ja käsiteltävä asianmukaisella huolella.

([2]) Käytännössä tämä voidaan tehdä valmistamalla testattavasta nesteestä ja selluloosasta 1:1-seosta suurempi määrä kuin kokeeseen tarvitaan ja siirtämällä 5 ± 0,1 g seosta paineastiaan. Seos on valmistettava tuoreeltaan joka koetta varten.

([3]) Erityisesti on estettävä kelan vierekkäisten kierteiden välinen kosketus.

▼B

2. **MITTAUSTULOKSET**

Paineen nousuun kuluneet ajat sekä testiaineelle että vertailuaineelle (-aineille). Paineen nousuun kuluneet ajat mahdollisille inertin aineen kanssa tehdyille testeille.

2.1 TULOSTEN KÄSITTEY

Lasketaan paineen nousuun kuluneiden aikojen keskiarvot sekä testiaineelle että vertailuaineelle (-aineille).

Lasketaan paineen nousuun kuluneiden aikojen keskiarvot mahdollisille inertin aineen kanssa tehdyille testeille.

Taulukossa 1 esitetään joitakin esimerkkejä tuloksista.

Taulukko 1

Esimerkkejä tuloksista ([a])

Aine ([b])	Keskimääräinen paineen nousuun kulunut aika 1:1 -selluloosaseokselle (ms)
Ammoniumdikromaatti, kyllästetty vesiliuos	20 800
Kalsiumnitraatti, kyllästetty vesiliuos	6 700
Ferrinitraatti, kyllästetty vesiliuos	4 133
Litiumperkloraatti, kyllästetty vesiliuos	1 686
Magnesiumperkloraatti, kyllästetty vesiliuos	777
Nikkelinitraatti, kyllästetty vesiliuos	6 250
Typpihappo, 65 %	4 767 ([c])
Perkloorihappo, 50 %	121 ([c])
Perkloorihappo, 55 %	59
Kaliumnitraatti, 30 % vesiliuos	26 690
Hopeanitraatti, kyllästetty vesiliuos	— ([d])
Natriumkloraatti, 40 % vesiliuos	2 555 ([c])
Natriumnitraatti, 45 % vesiliuos	4 133
Inertti aine	
Vesi: selluloosa	— ([d])

([a]) Ks. viite (1), YK:n kuljetusjärjestelmän mukainen luokitus.
([b]) Kyllästetyt liuokset on valmistettava 20 °C:ssa.
([c]) Laboratorioidenvälisten vertailevien tutkimusten keskiarvo.
([d]) Maksimipainetta 2 070 kPa ei saavutettu.

▼B

3. **TESTISELOSTE**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

— testattavan aineen tunnistetiedot, koostumus, puhtausaste jne.

— testiaineen pitoisuus,

— selluloosan kuivausmenetelmä,

— käytetyn selluloosan vesipitoisuus,

— mittaustulokset,

— inertin aineen kanssa mahdollisesti tehtyjen testien tulokset,

— paineen nousuun kuluvista ajoista lasketut keskiarvot,

— mahdolliset poikkeamat tästä menetelmästä ja syyt niihin,

— kaikki lisätiedot ja huomautukset, jotka voivat vaikuttaa tulosten tulkintaan.

3.2 TULOSTEN TULKINTA ([1])

Testitulosten arvioinnissa

a) todetaan, syttyykö testiaineen ja selluloosan seos itsestään ja

b) verrataan paineen nousuun (690 kPa – 2 070 kPa) kuluneiden aikojen keskiarvoja vertailuaine(id)en vastaaviin arvioihin.

Nestemäisen aineen katsotaan olevan hapettava, kun

a) testattavan aineen ja selluloosan 1:1-seos (massana) syttyy itsestään tai

b) testattavan aineen ja selluloosan 1:1-seoksella (massana) on pienempi tai yhtä suuri keskimääräinen paineen nousuun kuuluva aika kuin 65-painoprosenttisen typpihapon ja selluloosan 1:1-seoksella (massana).

Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi on tuloksia tulkittaessa tarkasteltava tarvittaessa myös tuloksia, jotka on saatu testattaessa ainetta inertin materiaalin kanssa.

([1]) Ks. viite 1, tulosten tulkinta YK:n kuljetusmäärysten mukaan käytettäessä useita vertailuaineita.

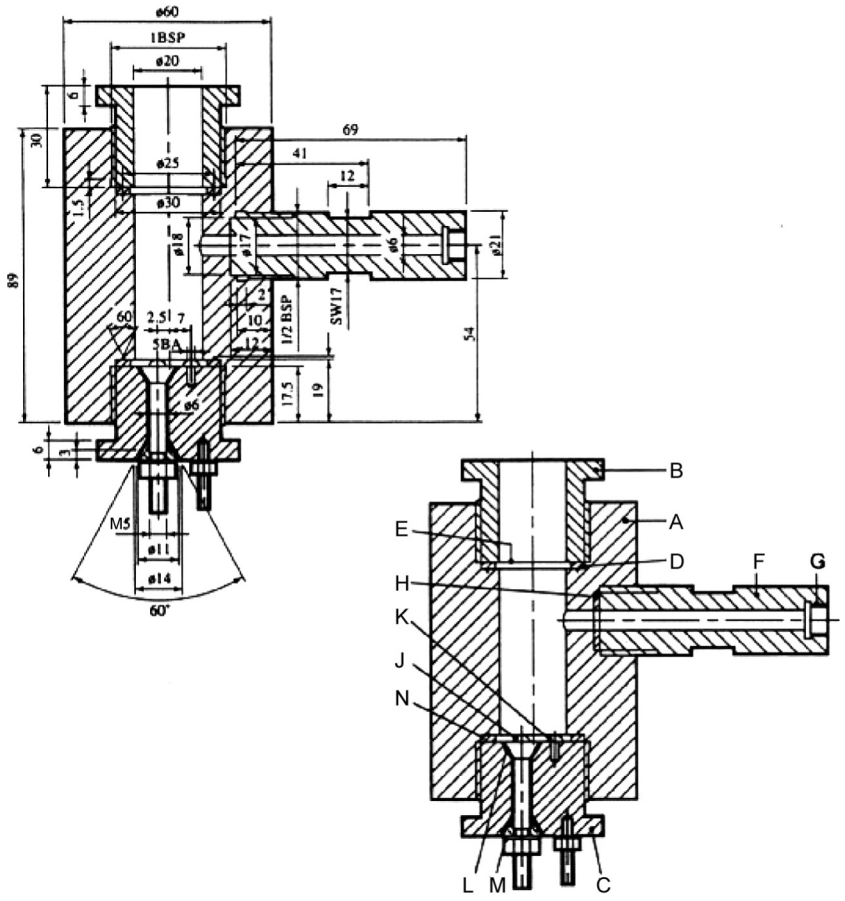
▼B

4. **KIRJALLISUUS**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3. tarkistettu painos. YK:n julkaisu nro ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, sivu 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Kuva1

Paineastia



(A) Paineastian runko-osa

(B) Varokalvoa paikallaan pitävä tulppa

(C) Sytytystulppa

(D) Pehmeä lyijytiiviste

(E) Varokalvo

(F) Sivuhaara

(G) Paineenmuuntimen pää

(H) Tiivistysrengas

(J) Eristetty elektrodi

(K) Maadoitettu elektrodi

(L) Eristys

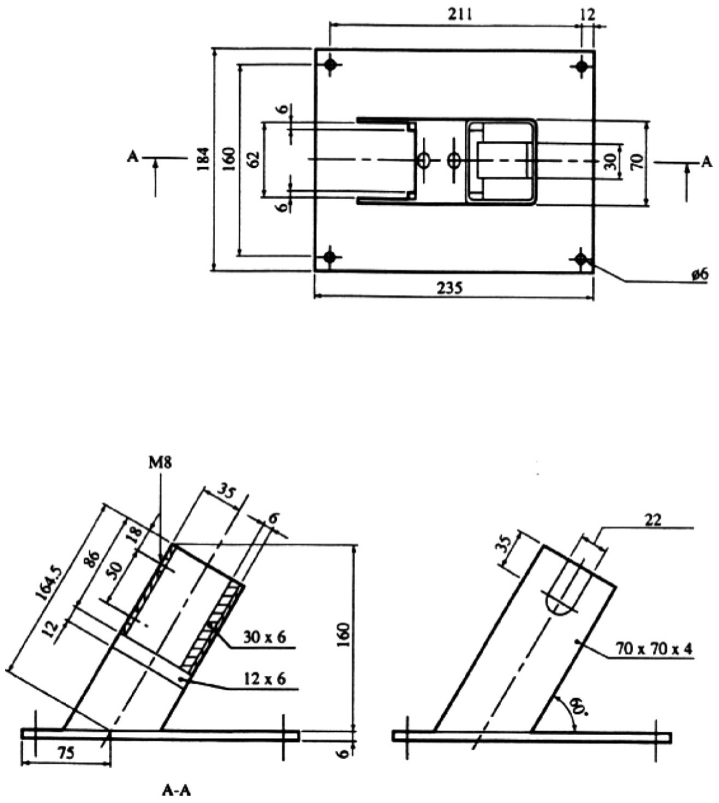
(M) Teräskartio

(N) Eristysrenkaan ura

▼B

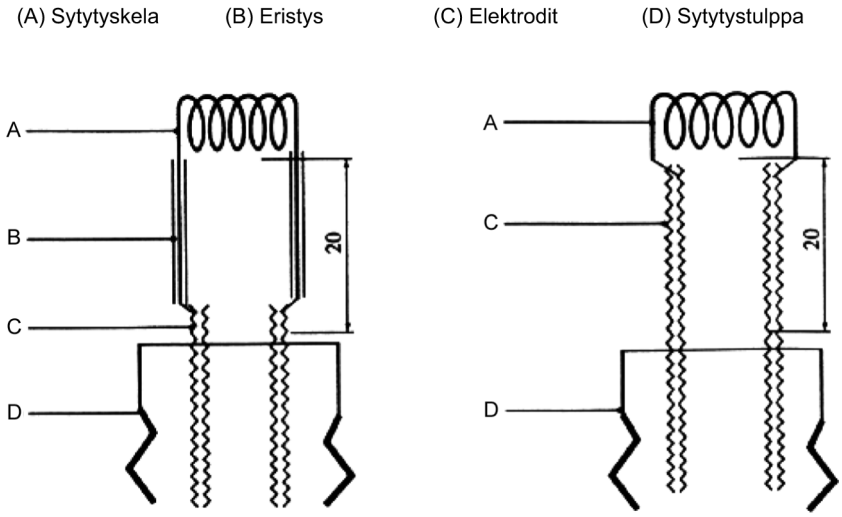
Kuva 2

Tukiteline



Kuva 3

Sytytysjärjestelmä



Huom: kokoonpanosta voidaan käyttää kumpaa hyvänsä.

▼M1

A.22. **KUITUJEN HALKAISIJAN PITUUSPAINOTETTU GEOMETRINEN KESKIARVO**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Tässä testiohjeessa kuvataan menettely, jolla voidaan mitata bulkkimateriaalien tai -tuotteiden sisältämien keinotekoisten mineraalikuitujen halkaisijan pituuspainotettu geometrinen keskiarvo (LWGMD, Length Weighted Geometric Mean Diameter). Koska populaation LWGMD on 95 prosentin todennäköisyydellä 95 prosentin luottamustasojen välillä (LWGMD ± 2 x keskivirhe), kirjattu arvo (testin tulos) on näytteen alempi 95 prosentin luottamustaso (ts. LWGMD miinus kaksi keskivirhettä). Menetelmän perustana on tarkistettu versio (kesäkuu 1994) HSE:n (Health and Safety Executive, UK) teknisestä menetelmästä, josta sovittiin ECFIA:n (European Ceramic Fibres Industry Association) ja HSE:n välisessä kokouksessa Chesterissä 26.9.1993 ja joka kehitettiin toista laboratorioiden välistä koetta varten sekä kyseisen kokeen tulosten perusteella (1, 2). Kyseisellä mittausmenetelmällä voidaan määrittää kuidun halkaisija bulkkimateriaaleissa tai -tuotteissa, jotka sisältävät keinotekoisia mineraalikuituja, esimerkiksi tulenkestäviä keraamisia kuituja, keinotekoisia lasikuituja ja yksikide- tai monikidekuituja.

Pituuspainotuksella kompensoidaan vaikutusta, jonka pitkien kuitujen särkymisellä (näytteenoton tai käsittelyn yhteydessä) on halkaisijoiden kokojakaumaan. Keinotekoisten mineraalikuitujen kokojakaumaa määritettäessä käytetään geometrisia tilastomuuttujia (geometrista keskiarvoa), koska näiden halkaisijoiden kokojakaumat ovat yleensä lähellä logaritmista normaalijakaumaa.

Kaikkien kuitujen pituuden ja halkaisijan mittaaminen on pitkällistä ja aikaavievää, mutta jos vain ne kuidut mitataan, jotka koskettavat äärettömän ohutta viivaa pyyhkäisyelektronimikroskoopin tarkastelukentässä, määrätyn kuidun valinnan todennäköisyys on suhteessa kyseisen kuidun pituuteen. Koska pituus on tätä kautta otettu huomioon pituuspainotetuissa mittauksissa, ainoa tarvittava mittaus on halkaisijan mittaus, jotta voidaan määrittää LWGMD miinus kaksi keskivirhettä.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Hiukkanen: kappale, jonka pituus-leveyssuhde on alle 3:1

Kuitu: kappale, jonka pituus-leveyssuhde (muotosuhde) on vähintään 3:1.

1.3 SOVELTAMISALA JA RAJOITUKSET

Menetelmä on suunniteltu määrittämään halkaisijoiden kokojakaumat, kun keskihalkaisija on välillä 0,5 μm – 6 μm. Tätä suurempia halkaisijoita voidaan mitata käyttämällä pienempiä pyyhkäisyelektronimikroskoopin suurennuksia, mutta menetelmän tarkkuus vähenee siirryttäessä pienempiin halkaisijoihin. Jos keskihalkaisija on alle 0,5 μm, suositellaan läpäisyelektronimikroskoopin käyttöä.

▼M1

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Kuituhuovasta tai irtonaisesta bulkkikuidusta otetaan useita edustavia kairausnäytteitä. Näytteiden pituutta lyhennetään murskaamalla, ja edustava näyte dispergoidaan veteen. Näytteestä otetaan osanäytteet, jotka suodatetaan polykarbonaattisuodattimen läpi (huokoskoko 0,2 μm) ja preparoidaan pyyhkäisyelektronimikroskoopilla tehtävää tutkimusta varten. Kuitujen halkaisijat mitataan vähintään suurennuksella 10 000 x ([1]) käyttäen viivan leikkauspistettä käyttävää menetelmää, jotta keskihalkaisija voidaan estimoida harhattomasti. Alempi 95 prosentin luottamustaso määritetään (yksipuolisen testin perusteella), jotta saadaan estimaatti materiaalin kuitujen halkaisijan geometrisen keskiarvon alimmasta arvosta.

1.5 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1 **Turvallisuus ja varotoimet**

Fyysinen altistus ilmassa leijuville kuiduille on minimoitava ja kuivien kuitujen käsittelyssä on käytettävä veto- tai hansikaskaappia. Fyysistä altistusta on seurattava määrävälein, jotta voidaan määrittää turvamenetelmien tehokkuus. Keinotekoisia mieneraalikuituja käsiteltäessä on käytettävä kertakäyttöhansikkaita ihoärsytyksen ehkäisemiseksi ja ristikontaminaation estämiseksi.

1.5.2 **Laitteet**

— Puristin ja puristusmuotit (paine 10 MPa)

— polykarbonaattisuodattimet, joiden halkaisija on 25 mm ja joissa on kapillaarihuokoset (huokoskoko 0,2 μm)

— selluloosaesterisuodatin (huokoskoko 5 μm) varasuodattimena

— lasinen suodatuslaite (tai kertakäyttösuodatinjärjestelmä), joka soveltuu halkaisijaltaan 25 mm:n kokosille suodattimille (esim. Milliporen lasinen mikroanalyysijärjestelmä, tyyppi XX10 025 00)

— vastatislattu vesi, joka on suodatettu (huokoskoko 0,2 μm) mikroorganismien poistamiseksi

— päällystyslaite (kulta tai kulta/palladium)

— pyyhkäisyelektronimikroskooppi, jonka erotuskyky 10 nm ja suurennus 10 000 x

— spaattelit, skalpelli (tyyppi 24), pinsetit, pyyhkäisyelektronimikroskoopin putket, hiililiima tai -teippi, kolloidinen hopea

— ultraäänisondi tai ultraäänihaude

— kairauslaite tai korkkipora kairausnäytteiden ottamiseksi kuituhuovasta.

([1]) Suurennus on tarkoitettu 3 μm:n kuiduille; 6 μm:n kuiduille voi soveltua paremmin suurennus 5 000 ×.

▼**M1**

1.5.3 **Testimenettely**

1.5.3.1 *Näytteenotto*

Kuituhuovasta tai -levystä otetaan näytteet 25 mm:n kairalla tai korkkiporalla. Näytteet pitäisi ottaa tasaisin välimatkoin, jos huopa on lyhyt, tai sattumanvaraisesti valituilta alueilta, jos huopa on pitkä. Samoja välineitä voidaan käyttää sattumanvaraisten näytteiden ottamiseksi irrallisesta kuidusta. Näytteitä on mahdollisuuksien mukaan otettava kuusi siten, että otetaan huomioon bulkkimateriaalin spatiaalinen vaihtelu.

Kaikki kuusi kairausnäytettä murskataan halkaisijaltaan 50:mm kokoisessa puristusmuotissa paineella 10 Mpa. Materiaali sekoitetaan spaattelilla ja puristetaan uudelleen paineella 10 MPa. Sen jälkeen materiaali poistetaan puristusmuotista ja varastoidaan sinetöityyn lasipulloon.

1.5.3.2 *Näytteiden preparointi*

Orgaaninen sideaine voidaan tarvittaessa poistaa panemalla kuitu uuniin (lämpötila 450 °C) noin tunniksi.

Näytteestä muodostetaan kartio, joka ositetaan neljään osaan (tämä olisi tehtävä vetokaapin sisällä).

Pieni määrä < 0,5 g) näytettä lisätään spaattelilla 100 ml:aan vastatislattua vettä, joka on suodatettu kalvosuodattimen läpi (huokoskoko 0,2 μm) (myös muulla tavalla valmistettua ultrapuhdasta vettä voidaan käyttää, jos sen voidaan osoittaa olevan tarkoitukseen sopivaa). Näyte dispergoidaan kokonaan ultraäänisondilla, jota käytetään 100 W:n teholla ja sellaisella säädöllä, että syntyy kavitaatiota. (Jos sondia ei ole käytettävissä, käytetään seuraavaa menetelmää: ravistellaan ja käännellään ylösalaisin 30 sekunnin ajan, pannaan viideksi minuutiksi ultraäänihauteeseen ja ravistellaan ja käännellään ylösalaisin uudelleen 30 sekunnin ajan.)

Välittömästi näytteen dispergoinnin jälkeen siitä otetaan osanäytteet (esim. kolme näytettä, 3, 6 ja 10 ml) käyttämällä leveäsuista pipettiä (kapasiteetti 2–5 ml).

Kukin osanäyte suodatetaan polykarbonaattivakuumisuodattimella (huokoskoko 0,2 μm), jonka yhteydessä on MEC-varmistussuodatin (huokoskoko 5 μm), käyttämällä 25 mm:n lasista suodatinsuppiloa, jossa on sylinterimäinen säiliö. Suppiloon pannaan noin 5 ml suodatettua tislattua vettä, ja osanäyte pipetoidaan hitaasti veteen pitäen pipetin päätä meniskuksen alla. Pipetti ja säiliö huuhdellaan perusteellisesti pipetoinnin jälkeen, koska ohuet kuidut jäävät usein pintoihin.

Suodatin poistetaan varovasti ja erotetaan varmistussuodattimesta ennen sen asettamista kuivumaan.

▼M1

Suodatinkalvolla olevasta saostumasta leikataan neljäsosa tai puolet skalpellilla (tyyppi 24) käyttämällä edestakaista liikettä. Leike kiinnitetään varovasti pyyhkäisyelektronimikroskoopin näytealustalle hiiliteipillä tai -liimalla. Kolloidihopeaa aplikoidaan vähintään kolmeen paikkaan, jotta sähkökontakti olisi parempi suodattimen ja näytealustan reunoilla. Kun liima tai kolloidinen hopea on kuivunut, kerroksen pinta päällystetään kullalla tai kulta-palladiumseoksella (paksuus noin 50 nm).

1.5.3.3 *Pyyhkäisyelektronimikroskoopin kalibrointi ja käyttö*

1.5.3.3.1 K a l i b r o i n t i

Pyyhkäisyelektronimikroskoopin kalibrointi on tarkistettava vähintään kerran viikossa (mieluiten kerran päivässä) käyttämällä sertifioitua kalibraattoria. Kalibrointi on tarkistettava sertifioituihin standardiarvoihin nähden, ja jos mitattu arvo ei ole ± 2 % sertifioidusta arvosta, kalibrointia on säädettävä ja se on tarkistettava uudelleen.

Pyyhkäisyelekronimikroskoopin erotuskyvyn on oltava vähintään sellainen, että sillä pystytään erottamaan 0,2 μm:n halkaisija (aito näytematriisi), kun suurennus on 2 000 x.

1.5.3.3.2 K ä y t t ö

Pyyhkäisyelektronimikroskooppia pitäisi käyttää suurennuksella 10 000 x olosuhteissa ([1]), jotka mahdollistavat hyvän erotuskyvyn hitailla pyyhkäisynopeuksilla (esim. 5 sekuntia/pyyhkäisy). Vaikka eri pyyhkäiselektronimikroskooppien käyttövaatimukset voivat vaihdella, parhaan näkyvyyden ja erotuskyvyn aikaansaamiseksi atomipainoltaan suhteellisen kevyillä materiaaleilla olisi käytettävä kiihdytysjännitettä 5–10 keV sekä pientä pyyhkäisypisteen kokoa ja lyhyttä työskentelyetäisyyttä. Suoritettaessa lineaarista pyyhkäisyä pitäisi käyttää 0°:n kallistuskulmaa uudelleenfokusoinnin minimoimiseksi, tai jos pyyhkäisyelektronimikroskoopissa on eusentrinen objektipöytä, tulisi käyttää eusentristä työskentelyetäisyyttä. Pienempää suurennusta voidaan käyttää, jos materiaali sisältää ainostaan suuria kuituja (halkaisija > 5 μm).

1.5.3.4 *Koon määritys*

1.5.3.4.1 T u t k i m u s p i e n i l l ä s u u r e n n u k s i l l a n ä y t t e e n a r v i o i m i s e k s i

Näyte arvioidaan aluksi pienillä suurennuksilla. Tällöin tarkistetaan, onko näytteessä suurien kuitujen rykelmiä, ja arvioidaan kuitujen tiheys. Jos kuidut esiintyvät paljon rykelminä, suositellaan uuden näytteen ottamista.

Tilastotulosten luotettavuuden takaamiseksi on mitattava riittävästi kuituja. Suuri kuitujen tiheys voi näyttää tämän vuoksi tarpeelliselta, koska tyhjien kenttien tutkimimen on aikaavievää eikä tue analyysiä. Jos suodatin on kuitenkin ylikuormattu, on vaikea mitata kaikkia mitattavissa olevia kuituja, ja koska suuret kuidut voivat peittää näkyvistä pienemmät kuidut, pienemmät kuidut voivat jäädä mittaamatta.

([1]) 3 μm:n kuitujen osalta ks. edellinen alaviite.

▼**M1**

LWGMD-arvon yliarvioiminen voi johtua kuitujen tiheyksistä, jotka ovat yli 150 kuitua yhtä lineaarisen pyyhkäisyn millimetriä kohti. Toisaalta pienet tiheydet pidentävät analyysiin tarvittavaa aikaa. Siksi on usein kustannustehokkaampaa preparoida näyte, jossa kuitujen tiheys on lähempänä optimia, kuin jatkaa mittauksia tiheyden ollessa pieni. Optimitiheys on sellainen, että yhtä näkökenttää kohti on keskimäärin yksi tai kaksi mitattavissa olevaa kuitua suurennuksella 5 000 x. Optimitiheys riippuu kuitenkin kuitujen koosta (halkaisijasta), joten tutkijan on harkittava, onko kuitujen tiheys optimaalinen vai ei.

1.5.3.4.2 Kuitujen halkaisijan pituuspainotus

Vain ne kuidut lasketaan, jotka koskettavat (äärettömän) ohutta viivaa (tai leikkaavat sen) pyyhkäisyelektronimikroskoopin näkökentässä. Tätä varten näkökentän keskustan yli vedetään vaakasuora (tai pystysuora) viiva.

Vaihtoehtoisesti näkökentän keskelle asetetaan yksi piste ja käynnistetään jatkuva pyyhkäisy yhteen suuntaan suodattimen yli. Jokainen kuitu, jonka muotosuhde on yli 3:1 ja joka koskettaa tätä pistettä tai leikkaa sen, mitataan ja kirjataan.

1.5.3.4.3 Kuitujen koon määritys

Suositellaan, että vähintään 300 kuitua mitataan. Kukin kuitu mitataan vain kerran kohdassa, jossa se leikkaa kentässä olevan viivan tai pisteen (tai leikkauskohtaa lähellä olevassa kohdassa, jos kuidun reunat peittyvät näkyvistä). Jos kuidun poikkileikkaukset eivät ole kauttaaltaan samat, on käytettävä mittausta, joka edustaa kuidun keskiarvoa. Reuna on määriteltävä huolellisesti ja mitattava lyhyin välimatka kuidun reunojen välillä. Mittaukset voidaan tehdä suoraan tai (valo)kuvista. Käytettäväksi suositellaan puoliautomaattisia mittausjärjestelmiä, jotka lataavat tiedot suoraan laskentataulukkoon, koska ne säästävät aikaa, eliminoivat kopiointivirheiden mahdollisuuden, ja laskenta voidaan automatisoida.

On tarkistettava pienellä suurennuksella, että pitkien kuitujen päät eivät kierry takaisin mittauskenttään ja että ne mitataan vain kerran.

2. TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Kuitujen halkaisijat eivät tavallisesti edusta normaalijakaumaa. Logaritmimuunnoksen avulla on kuitenkin mahdollista saada jakauma, joka on lähellä normaalijakaumaa.

Lasketaan n kuitujen halkaisijan (D) luonnollisten logaritmien (lnD) aritmeettinen keskiarvo (keskiarvo lnD) ja keskihajonta (SD_{lnD}).

$$\text{mean lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Keskihajonta jaetaan mittausten lukumäärän (n) neliöjuurella keskivirheen (SE_{lnD}) määrittämiseksi.

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Vähennetään keskiarvosta 2 x keskivirhe ja määritetään tämän arvon (keskiarvo miinus 2 x keskivirhe) eksponenttiarvo, mikä antaa geometrisen keskiarvon miinus 2 x geometrinen keskivirhe.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mittl. } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **RAPORTOINTI**

TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava ainakin seuraavat tiedot:

— arvo LWGMD miinus 2 x keskivirhe

— mahdolliset poikkeamiset testimenettelystä (erityisesti ne, joilla voi olla vaikutusta tulosten tarkkuuteen tai luotettavuuteen) perusteluineen.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23 JAKAANTUMISKERROIN (1-OKTANOLI-VESI): HITAAN SEKOITUKSEN MENETELMÄ

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 123 (2006). 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen (P_{ow}) arvot on määritetty tarkasti log P_{ow} 8,2 -arvoon asti hitaan sekoituksen menetelmällä (1). Näin ollen se on sopiva kokeellinen lähestymistapa erittäin hydrofobisten aineiden P_{ow}-arvon suoraan määrittämiseen.

2. Muita menetelmiä 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen (P_{ow}) määrittämistä varten ovat ravistuspullomenetelmä (2) sekä P_{ow}-arvon määrittäminen käänteisfaasi-HPLC:n retentiokäyttäytymisestä (3). Ravistuspullomenetelmä on altis virheille, mikä johtuu oktanolin mikropisaroiden siirtymisestä vesifaasiin. Suurenevien P_{ow}-arvojen yhteydessä näiden pisaroiden esiintyminen vesifaasissa johtaa siihen, että testiaineen pitoisuus vedessä arvioidaan liian suureksi Sen vuoksi tämän menetelmän käyttö on rajattu aineisiin, joiden log P_{ow} -arvo on pienempi kuin 4. Toinen menetelmä perustuu suoraan määritetyistä P_{ow}-arvoista saatuihin varmoihin tietoihin, jolloin HPLC-retentiokäyttäytymisen ja mitattujen P_{ow}-arvojen välinen suhde voidaan kalibroida. Saatavilla oli OECD:n ohjeluonnos ionisoituvien aineiden 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen määrittämiseen (4), mutta sitä ei tule enää käyttää.

3. Tämä testimenetelmä on kehitetty Alankomaissa. Tässä kuvattujen menetelmien tarkkuus on validoitu ja optimoitu laboratorioiden välisessä validointitutkimuksessa, johon osallistui 15 laboratoriota (5).

ALUSTAVAT HUOMIOT

Merkitys ja käyttö

4. Inerttien orgaanisten aineiden yhteydessä on löydetty erittäin merkittäviä suhteita 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimien (P_{ow}) ja niiden kaloihin kohdistuvan biokertyvyyden väliltä. Lisäksi on osoitettu, että P_{ow}-arvo korreloi kaloihin kohdistuvaan myrkyllisyyteen sekä kemikaalien imeytymiseen kiinteään ainekseen, kuten maaperään ja sedimentteihin. Viitteessä (6) on esitetty kattava yhteenveto näistä suhteista.

5. 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen ja aineen muiden, ympäristömyrkyllisyyden ja kemian kannalta tärkeiden ominaisuuksien väliltä on määritetty monia erityyppisiä suhteita. Tämän vuoksi 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimesta on tullut keskeinen parametri kemikaalien ympäristöriskien arvioinnissa sekä kemikaalien ympäristövaikutusten ennustamisessa.

Soveltamisala

6. Hitaan sekoituksen kokeen oletetaan vähentävän mikropisaroiden muodostumista 1-oktanolipisaroista vesifaasissa. Tämän vuoksi vesipitoisuutta, joka johtuu testiaineen tällaisiin pisaroihin liittyvistä molekyyleistä, ei arvioida liian suureksi. Näin ollen hitaan sekoituksen menetelmä sopii erityisesti sellaisten aineiden P_{ow}-arvon määrittämiseen, joiden oletetut log P_{ow} -arvot ovat vähintään 5, sillä tällaisten aineiden osalta ravistuspullomenetelmä (2) tuottaa helposti virheellisiä tuloksia.

▼M4

MÄÄRITELMÄ JA YKSIKÖT

7. Aineen jakaantumiskerroin veden ja lipofiilisen liuottimen (1-oktanolin) välillä kuvastaa kemikaalin tasapainon jakaantumista kahden faasin välillä. Määritelmän mukaan veden ja 1-oktanolin välinen jakaantumiskerroin (P_{ow}) on testiaineen tasapainopitoisuuksien välinen suhde vedellä kyllästetyssä 1-oktanolissa (C_O) ja 1-oktanolilla kyllästetyssä vedessä (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Pitoisuuksien suhteena se on paljas luku. Yleensä se ilmoitetaan kymmenkantaisena logaritmina (log P_{ow}). P_{ow} on lämpötilasta riippuvainen, ja raportoiduissa tiedoissa on oltava myös mittauslämpötila.

MENETELMÄN PERIAATE

8. Jakaantumiskertoimen määritystä varten vesi, 1-oktanoli ja testiaine tasapainotetaan toistensa kanssa vakiolämpötilassa. Sen jälkeen määritetään testiaineen pitoisuudet kahdessa faasissa.

9. Kokeellisia vaikeuksia, jotka liittyvät mikropisaroiden muodostumiseen ravistuspullokokeen aikana, voidaan vähentää hitaan sekoituksen menetelmällä, jota tässä luvussa kuvataan. Hitaan sekoituksen menetelmässä vesi, 1-oktanoli ja testiaine tasapainotetaan termostaatilla varustetussa sekoitusreaktorissa. Faasien vaihtumista nopeutetaan sekoittamalla. Sekoittaminen saa aikaan rajatun turbulenssin, joka parantaa 1-oktanolin ja veden vaihtumista ilman, että mikropisaroita (1) muodostuu.

TESTIN SOVELTUVUUS

10. Koska muiden aineiden kuin testiaineen läsnäolo saattaa vaikuttaa testiaineen aktiivisuuskertoimeen, testiaine on testattava puhtaana aineena. 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskerroinkoetta varten on käytettävä puhtainta kaupallisesti saatavilla olevaa ainetta.

11. Tätä menetelmää sovelletaan puhtaisiin aineisiin, jotka eivät dissosioidu tai assosioidu ja jotka eivät vaikuta merkittävästi pintojen väliseen toimintaan. Menetelmää voidaan käyttää tällaisten aineiden ja seosten 1-oktanoli-vesi-jakaantumissuhteen määrittämiseen. Kun menetelmää käytetään seosten yhteydessä, määritetyt 1-oktanoli-vesi-jakaantumissuhteet ovat ehdollisia, ja ne määräytyvät testatun seoksen kemiallisen koostumuksen ja vesifaasina käytetyn elektrolyytin koostumuksen mukaisesti. Lisävaiheita käyttämällä menetelmä soveltuu myös yhdisteiden dissosioimiseen tai assosioimiseen (12 kohta).

12. Koska dissosioituvien aineiden, kuten orgaanisten happojen ja fenoleiden, orgaanisten emästen ja organometallisten aineiden, 1-oktanoli-vesi-jakaantumiseen osallistuvassa vedessä ja 1-oktanolissa on monia tasapainotiloja, 1-oktanoli/vesi-jakaantumissuhde on ehdollinen, ja siihen vaikuttaa vahvasti elektrolyytin koostumus (7) (8). Sen vuoksi 1-oktanoli/vesi-jakaantumissuhteen määrittäminen edellyttää, että pH:ta ja elektrolyytin koostumusta seurataan kokeen aikana, ja niitä koskevat tiedot on raportoitava. Näiden jakaantumissuhteiden arvioinnissa on käytettävä asiantuntijoita. Sopivat pH-arvot on valittava dissosiaatiovakion (-vakioiden) arvoa käyttämällä, jotta jakaantumissuhde voidaan määrittää jokaista ionisaatiotilaa varten. Organometallisia yhdisteitä (8) käytettäessä on käytettävä ei-kompleksoivia puskureita. Kun otetaan huomioon nykyinen tietämys vesikemiasta (muodostumisvakiot, dissosiaatiovakiot), koeolosuhteet on valittava siten, että testiaineen spesifikaatio vesifaasissa voidaan arvioida. Ionivahvuuden on oltava sama kaikissa kokeissa, mikä saadaan aikaan käyttämällä taustaelektrolyyttiä.

▼M4

13. Testattaessa aineita, joiden vesiliukoisuus on huono tai P_{ow}-arvo suuri, voi ilmetä ongelmia, sillä kun pitoisuudet vedessä ovat hyvin pieniä, niiden määrittäminen tarkasti on vaikeaa. Tässä testimenetelmäkuvauksessa annetaan myös ohjeita tämän ongelman ratkaisemiseen.

TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

14. Kemiallisten reagenssien on oltava analyysilaatua tai sitä puhtaampia. On suositeltavaa käyttää merkitsemättömiä, koostumukseltaan tunnettuja ja mieluiten vähintään 99-prosenttisen puhtaita testiaineita tai koostumukseltaan ja radiokemialliselta puhtaudeltaan tunnettuja radioaktiivisesti merkittyjä testiaineita. Jos merkkiaineiden puoliintumisajat ovat lyhyitä, on tehtävä hajoamiskorjauksia. Radioaktiivisesti merkittyjen testiaineiden yhteydessä on käytettävä kemiallisesti tarkkaa analyysimenetelmää, jotta voidaan varmistaa, että mitattu radioaktiivisuus liittyy suoraan testiaineeseen.

15. Arvio log P_{ow} -arvosta voidaan hankkia käyttämällä kaupallisesti saatavia ohjelmia, jotka on tarkoitettu log P_{ow} -arvon estimointiin, tai käyttämällä liukoisuuksien suhdetta kummassakin liuottimessa.

16. Testiaineesta on oltava seuraavat tiedot saatavilla ennen P_{ow}-arvon määrittämiseen tarkoitetun hitaan sekoituksen kokeen toteuttamista:

a) rakennekaava

b) sopivat analyysimenetelmät aineen pitoisuuden määrittämiseen vedessä ja 1-oktanolissa

c) ionisoituvien aineiden dissosiaatiovakio(t) (OECD:n ohje 112 (9))

d) vesiliukoisuus (10)

e) abioottinen hydrolyysi (11)

f) biologinen hajoavuus (12)

g) höyrynpaine (13).

MENETELMÄN KUVAUS

Välineet ja laitteet

17. Kokeeseen tarvitaan vakiolaboratoriolaitteisto, erityisesti seuraavat:

— magneettisekoittimia ja teflonpäällysteisiä magneettisekoitinsauvoja vesifaasin sekoittamista varten

— analyysivälineet, jotka soveltuvat testiaineen konsentraation määrittämiseen oletettuina pitoisuuksina

— sekoitusastia, jossa on hana pohjassa. Testiyhdisteen arvioidun log P_{ow} -arvon ja havaitsemisrajan (LOD:n) mukaan on harkittava samanmuotoisen, tilavuudeltaan yli litran suuruisen reaktioastian käyttämistä, jotta kemiallista erottelua ja analyysia varten saadaan riittävästi vettä. Tällöin vesiuutteen pitoisuudet ovat suurempia, jolloin analyyttinen määrittäminen on luotettavampaa. Lisäyksessä 1 on taulukko, jossa esitetään arviot tarvittavasta vähimmäismäärästä, yhdisteen havaitsemisraja, sen arvioitu log P_{ow} sekä sen vesiliukoisuus. Taulukko perustuu log P_{ow} -arvon ja oktanoli- ja vesiliukoisuuksien väliseen suhteeseen Pinsuwanin ja muiden mukaan (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

kun

$SR = S_{oct}/S_w$ (yksikkönä molaarisuus);

sekä Lymanin (15) esittämään suhteeseen, joka liittyy vesiliukoisuuden ennustamiseen. Lisäyksessä 1 olevalla yhtälöllä laskettuja vesiliukoisuuksia on pidettävä alustavana arviona. Todettakoon, että käyttäjä voi laatia arvion vesiliukoisuudesta käyttämällä mitä tahansa suhdetta, jonka käyttäjä katsoo edustavan hydrofobisuuden ja liukoisuuden suhdetta paremmin. Esimerkiksi kiinteiden yhdisteiden osalta on suositeltavaa, että liukoisuuden ennustamisessa käytetään myös sulamispistettä. Kun käytetään muunnettua yhtälöä, on varmistettava, että oktanolissa liukoisuuden laskemisessa käytetty yhtälö on edelleen validi. Lisäyksessä 2 on kaaviokuva lasisesta sekoitusastiasta, jonka tilavuus on noin yksi litra. Lisäyksessä 2 olevan astian mittasuhteet ovat osoittautuneet suotuisiksi, ja ne on säilytettävä, jos käytetään erikokoista laitetta.

— On tärkeää, että lämpötila pidetään vakiona hitaan sekoituksen kokeen aikana jollakin tavalla.

18. Astioiden on oltava valmistettu inertistä materiaalista, jotta imeytyminen astian pintoihin on mahdollisimman vähäistä.

Testiliuosten valmisteleminen

19. P_{ow}-arvo on määritettävä puhtaimmalla 1-oktanolilla (vähintään + 99 prosenttia), jota on saatavilla kaupallisesti. 1-oktanolin puhdistaminen happo-, emäs- ja vesiuutolla ja sen jälkeinen kuivaaminen on suositeltavaa. 1-oktanolin puhdistamiseen voidaan käyttää myös tislausta. Puhdistettua 1-oktanolia käytetään testiaineiden standardiliuosten valmistamiseen. P_{ow}-arvon määrittämisessä käytettävän veden on oltava lasi- tai kvartsilaitteessa tislattua tai puhdistusjärjestelmästä hankittua. Myös HPLC-laatuista vettä voi käyttää. Tislattu vesi on suodatettava 0,22 mm:n suodattimen läpi, ja sokeanäytteillä on varmistettava, ettei konsentroiduissa uutteissa ole epäpuhtauksia, jotka voivat vaikuttaa testiaineeseen. Jos käytetään lasikuitusuodatinta, se on puhdistettava kuumentamalla sitä uunissa vähintään kolme tuntia 400 °C:ssa.

20. Molemmat liuottimet kyllästetään ennen koetta tasapainottamalla ne riittävän suuressa astiassa. Tämä tehdään sekoittamalla kaksifaasijärjestelmää hitaasti kahden päivän ajan.

21. Riittävä pitoisuus testiainetta valitaan ja liuotetaan 1-oktanoliin (joka on kyllästetty vedellä). 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin täytyy määrittää 1-oktanolin ja veden laimeissa liuoksissa. Sen vuoksi testiaineen pitoisuus saa olla kummassakin faasissa enintään 70 prosenttia sen liukoisuudesta, kun enimmäiskonsentraatio on 0,1 M (1). Kokeessa käytettävissä 1-oktanoliliuoksissa ei saa olla suspendoitunutta kiinteää testiainetta.

22. Riittävä pitoisuus testiainetta liuotetaan 1-oktanoliin (joka on kyllästetty vedellä). Jos log P_{ow} -arvon estimaatti on suurempi kuin viisi, on varmistettava huolella, ettei kokeessa käytetyissä 1-oktanoliliuoksissa ole suspendoitunutta kiinteää testiainetta. Tätä varten sovelletaan jäljempänä kuvattua menetelmää, joka koskee sellaisia kemikaaleja, joiden arvioitu log P_{ow} -arvo on suurempi kuin 5:

— Testiaine liuotetaan 1-oktanoliin (joka on kyllästetty vedellä).

▼M4

— Liuoksen annetaan seistä riittävä aika, jotta suspendoitunut kiinteä aines saostuu. Testiaineen pitoisuutta seurataan saostumisen aikana.

— Kun 1-oktanoliliuoksesta mitattujen pitoisuuksien arvot ovat vakiintuneet, kantaliuos laimennetaan sopivalla määrällä 1-oktanolia.

— Laimennetun kantaliuoksen pitoisuus mitataan. Jos mitattu pitoisuus on yhdenmukainen laimennuksen kanssa, laimennettua kantaliuosta voidaan käyttää hitaan sekoituksen menetelmällä tehtävässä kokeessa.

Näytteiden uutto ja analysointi

23. Testiaineen määrityksissä on käytettävä validoitua analyysimenetelmää. Tutkijoiden on esitettävä todisteet siitä, että pitoisuudet vedellä kyllästetyssä 1-oktanolissa ja 1-oktanolilla kyllästetyssä vesifaasissa ovat kokeen aikana käytettyjen analyysimenetelmien määritysrajaa suuremmat. Testiaineen saanto on analysoitava vesifaasista ja 1-oktanolifaasista ennen kokeen suorittamista niissä tapauksissa, joissa tarvitaan uuttomenetelmiä. Analyyttiset signaalit on korjattava nollakokeita varten, ja on syytä varmistaa, ettei yhdestä näytteestä peräisin oleva analyytti voi kontaminoida toista analyyttia.

24. Vesifaasin uutto orgaanisella liuottimella ja uutteen esikonsentrointi on todennäköisesti tarpeen ennen analyysia, koska hydrofobisten testiaineiden pitoisuudet ovat melko pienet vesifaasissa. Samasta syystä mahdollisten nollanäytteiden pitoisuuksia täytyy pienentää. Siinä on käytettävä erittäin puhtaita liuottimia, ensisijaisesti sellaisia, jotka on tarkoitettu jäämien analysointiin. Myös työskentely huolellisesti esipuhdistetuilla (esimerkiksi liuotinpesulla tai korkeassa lämpötilassa kuumentamalla) lasivälineillä voi auttaa välttämään ristikontaminaatiota.

25. Estimaatti log P_{ow} -arvosta voidaan hankkia estimointiohjelman tai asiantuntija-arvion avulla. Jos arvo on suurempi kuin kuusi, nollakokeen korjauksia ja analyyttien siirtymistä on seurattava tiiviisti. Vastaavasti myös silloin, kun log P_{ow} -arvo on suurempi kuin kuusi, standardin (surrogaatin) käyttäminen saannon korjaamisessa on pakollista suurten esikonsentrointikertoimien saavuttamiseksi. Saatavilla on kaupallisia ohjelmia log Pow -arvon estimointiin ([1]), esimerkiksi Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) ja ACD log P (19). Erilaisia estimointitapoja on kuvattu viitteissä (20–22).

26. Testiaineen pitoisuuden määrittämisessä 1-oktanolissa ja vedessä käytettävät määritysrajat (LOQ) selvitetään hyväksytyillä menetelmillä. Pääsääntö on se, että määritysraja voidaan määrittää sellaiseksi pitoisuudeksi vedessä tai 1-oktanolissa, joka tuottaa signaali-kohinasuhteeksi kymmenen. On valittava sopiva uutto- ja esikonsentrointimenetelmä, ja myös analyyttiset saannot on täsmennettävä. On valittava myös sopiva esikonsentrointikerroin, jotta analyyttisen määrityksen perusteella saadaan vaaditun kokoinen signaali.

([1]) Näiden tietojen tarkoituksena on vain helpottaa käyttäjän työtä. Muita vastaavia tietokoneohjelmia voi käyttää, jos voidaan osoittaa, että ne antavat samat tulokset.

▼M4

27. Analyysimenetelmän parametrien ja oletettujen pitoisuuksien perusteella määritetään likimääräinen näytekoko, jota yhdisteen pitoisuuden tarkka määrittäminen edellyttää. On vältettävä käyttämästä sellaisia vesinäytteitä, jotka ovat liian pieniä riittävän analyyttisen signaalin tuottamiseksi. Toisaalta myös liian suurten vesinäytteiden käyttämistä on vältettävä, koska muuten voi jäädä liian vähän vettä käytettäväksi vaadittujen analyysien vähimmäismäärän toteuttamiseksi (n = 5). Lisäyksessä 1 vähimmäisnäytemäärä on ilmoitettu astian tilavuuden, testiaineen havaitsemisrajan ja testiaineen liukoisuuden funktiona.

28. Testiaineiden kvantifiointi tehdään vertailemalla kunkin yhdisteen kalibrointikäyriä. Analysoitujen näytteiden pitoisuuksien on oltava standardien pitoisuusalueella.

29. Sellaisten testiaineiden osalta, joiden log P_{ow} -estimaatti on suurempi kuin kuusi, surrogaattistandardi on lisättävä vesinäytteeseen ennen uuttoa, jotta voidaan kirjata vesinäytteiden uuton ja esikonsentroinnin aikana tapahtuvat hävikit. Jotta saanto voidaan korjata tarkasti, surrogaateilla on oltava hyvin samankaltaiset tai identtiset ominaisuudet kuin testiaineella. Tähän tarkoitukseen on käytettävä ensisijaisesti (vakaita) kyseisten aineiden isotooppimerkittyjä analogeja (esimerkiksi deuteroituja tai ^{13}C-leimattuja). Jos leimattuja vakaita isotooppeja, kuten ^{13}C:ta tai ^{2}H:ta ei voida käyttää, on osoitettava luotettavien kirjallisuustietojen perusteella, että surrogaatin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ovat hyvin samanlaiset kuin testiaineen. Vesifaasin neste-nesteuuton aikana voi muodostua emulsioita. Sitä voidaan vähentää lisäämällä suolaa ja antamalla emulsion seistä yön yli. Näytteiden uuttoon ja esikonsentrointiin käytetyt menetelmät on ilmoitettava.

30. 1-oktanolifaasista otetut näytteet voi tarvittaessa laimentaa sopivalla liuottimella ennen analyysia. Lisäksi on suositeltavaa käyttää surrogaattistandardeja saannon korjaamiseen sellaisten aineiden yhteydessä, joiden saantokokeet osoittivat, että kokeissa esiintyy suurta vaihtelua (suhteellinen keskihajonta > 10 %).

31. Analyysimenetelmä on kuvattava yksityiskohtaisesti. Tähän sisältyvät uuttomenetelmä, esikonsentrointi ja laimennuskertoimet, instrumenttiparametrit, kalibrointirutiini, kalibrointialue, testiaineen saanto vedestä analysoituna, saannon korjaamiseksi lisätyt surrogaattistandardit, nollanäytteet, havaitsemisraja ja määritysrajat.

Testin suorittaminen

Optimaaliset 1-oktanolin ja veden tilavuuden suhteet

32. Valittaessa veden ja 1-oktanolin tilavuuksia on otettava huomioon määritysraja l-oktanolissa ja vedessä, vesinäytteisiin sovelletut esikonsentrointikertoimet, 1-oktanolista ja vedestä kerättyjen näytteiden määrä sekä odotuksenmukaiset pitoisuudet. Kokeeseen liittyvistä syistä 1-oktanolin tilavuus hitaan sekoituksen menetelmässä on valittava siten, että 1-oktanolikerros on riittävän paksu (> 0,5 cm), jotta 1-oktanolifaasista voidaan ottaa näyte häiritsemättä sitä.

33. Tyypilliset faasien tilavuudet, joita käytetään sellaisten yhdisteiden määrityksissä, joiden log P_{ow} -arvot ovat vähintään 4,5, ovat 20–50 ml 1-oktanolia ja 950–980 ml vettä yhden litran astiassa.

▼M4

Testiolosuhteet

34. Testin aikana reaktioastiaa säädellään termostaatilla, jotta lämpötilan vaihtelu voidaan pitää pienempänä kuin 1 °C. Testi on tehtävä 25 °C:n lämpötilassa.

35. Koejärjestelmä on suojattava päivänvalolta joko tekemällä koe pimeässä huoneessa tai peittämällä reaktioastia alumiinifoliolla.

36. Koe on tehtävä pölyttömässä ympäristössä (mikäli mahdollista).

37. 1-oktanoli-vesi-järjestelmää sekoitetaan, kunnes tasapainotila saavutetaan. Pilottikokeessa tasapainotilan saavuttamiseen kuluvaa aikaa arvioidaan toteuttamalla hitaan sekoituksen menetelmällä tehtävä koe ja ottamalla säännöllisesti näytteitä vedestä ja 1-oktanolista. Näytteet on otettava vähintään viiden tunnin mittaisen ajanjakson aikana.

38. Jokainen P_{ow}-arvo on määritettävä käyttämällä vähintään kolmea toisistaan riippumatonta hitaan sekoituksen menetelmällä tehtävää koetta.

Tasapainotilan saavuttamisajan määrittäminen

39. Tasapainotila oletetaan saavutetuksi, kun 1-oktanolin ja veden pitoisuussuhde aikaan nähden neljän aikapisteen pituisella ajanjaksolla tuottaa tulokseksi kulmakertoimen, joka ei eroa merkittävästi nollasta, kun p = 0,05. Tasapainotilan saavuttamisessa vähimmäisaika on yksi päivä, ennen kuin näytteenoton voi aloittaa. Pääsääntö on se, että sellaisista aineista, joiden log P_{ow} -estimaatti on pienempi kuin viisi, voidaan ottaa näytteitä toisena ja kolmantena päivänä (päivät 2 ja 3). Tavallista hydrofobisempien yhdisteiden kohdalla tasapainotilan saavuttaminen saattaa kestää kauemmin. Yhdisteellä, jonka log P_{ow} -arvo oli 8,23 (dekaklorobifenyyli), tasapainotilan saavuttaminen kesti 144 tuntia. Tasapainotilaa arvioidaan ottamalla jokaisesta astiasta toistuvasti näytteitä.

Kokeen aloittaminen

40. Kokeen alussa reaktioastia täytetään 1-oktanolilla kyllästetyllä vedellä. Termostaatilla säädetyn lämpötilan saavuttamiseen on varattava riittävästi aikaa.

41. Haluttu määrä testiainetta (joka on liuotettu tarvittavaan määrään vedellä kyllästettyä 1-oktanolia) lisätään reaktioastiaan varovasti. Tämä on tärkeä vaihe kokeessa, koska on vältettävä sekoittamasta näitä kahta faasia siten, että syntyy pyörteisyyttä. Sitä varten 1-oktanolifaasi voidaan pipetoida hitaasti koeastian seinää vasten lähellä veden pintaa. Se valuu hitaasti lasiseinää pitkin ja muodostaa kalvon vesifaasin yläpuolelle. 1-oktanolin dekantointia suoraan pulloon on aina vältettävä, sillä 1-oktanolipisaroita ei saa tippua suoraan veteen.

42. Sekoittamisen aloituksen jälkeen sekoitusnopeutta on lisättävä hitaasti. Jos sekoitusmoottoreita ei voida säätää asianmukaisesti, on harkittava muuntajan käyttöä. Sekoitusnopeutta on mukautettava siten, että veden ja 1-oktanolin yhtymäkohtaan muodostuu vortex-ilmiö, jonka syvyys on vähintään 0,5 cm ja enintään 2,5 cm. Sekoitusnopeutta on pienennettävä, jos vortex-ilmiön syvyys ylittää 2,5 cm. Muutoin 1-oktanolipisaroista saattaa muodostua vesifaasiin mikropisaroita, jolloin testiaineen pitoisuus vedessä arvioidaan liian suureksi. Laboratorioiden välisen validointitutkimuksen (5) löydösten perusteella enimmäissekoitusnopeudeksi suositellaan 2,5 cm:ä. Se on kompromissi, jolla varmistetaan nopea tasapainottuminen ja rajoitetaan 1-oktanolin mikropisaroiden muodostumista.

▼M4

Näytteenotto ja näytteiden käsittely

43. Sekoitin on kytkettävä pois päältä ennen näytteenottoa, ja nesteiden liikkeen on annettava pysähtyä. Kun näytteet on otettu, sekoitin käynnistetään uudelleen hitaasti edellä kuvatun mukaisesti, ja sekoitusnopeutta lisätään vähitellen.

44. Vesifaasin näyte otetaan reaktioastian pohjassa olevan venttiilin kautta. Poista aina hanoissa oleva kuollut tilavuus vettä (lisäyksessä 2 kuvatussa astiassa noin 5 ml). Hanoissa olevaa vettä ei sekoiteta, joten se ei ole tasapainossa bulkin kanssa. Merkitse vesinäytteiden tilavuus ylös ja varmista, että poisheitetyssä vedessä olleen testiaineen määrä otetaan huomioon massatasetta laskettaessa. Haihtumishäviöt on minimoitava antamalla veden virrata hitaasti erotussuppiloon siten, ettei siitä aiheudu vesi-/1-oktanolikerrokseen kohdistuvaa häiriötä.

45. 1-oktanolinäytteet hankitaan ottamalla pieni alikvootti (noin 100 µl) 1-oktanolikerroksesta 100 mikrolitran lasikuitu-metalliruiskulla. Näyte on otettava varovasti siten, ettei rajakohta rikkoudu. Näytenesteen tilavuus merkitään muistiin. Pieni alikvootti riittää, koska 1-oktanolinäyte laimennetaan.

46. Näytteen käsittelyssä on vältettävä tarpeettomia siirtovaiheita. Sitä varten näytteen tilavuus on määritettävä gravimetrisesti. Vesinäytteiden osalta se voidaan tehdä keräämällä vesinäyte erotussuppiloon, jossa jo on tarvittava määrä liuotinta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

47. Nykyisen testimenetelmän mukaan P_{ow}-arvo määritetään tekemällä tutkittavalla yhdisteellä kolme hitaan sekoituksen koetta (kolme kokeellista yksikköä), joissa käytetään identtisiä olosuhteita. Tasapainotilan saavuttamisen osoittamisessa käytettävän regression on perustuttava vähintään neljän peräkkäisistä aikapisteistä tehtyjen Co-/Cw-määrityksen tuloksiin. Näin voidaan laskea varianssi kustakin kokeellisesta yksiköstä saadun keskiarvon epävarmuuden mittana.

48. P_{ow}-arvoa voidaan luonnehtia kustakin kokeellisesta yksiköstä saatujen tietojen varianssilla. Tämän tiedon avulla lasketaan P_{ow}-arvo yksittäisten kokeellisten yksikköjen tulosten painotettuna keskiarvona. Sitä varten painona käytetään kokeellisten yksikköjen tulosten varianssin käänteislukua. Tällä tavalla tiedot, joiden variaatio (joka ilmaistaan varianssina) on suuri ja jotka ovat siten vähemmän luotettavia, vaikuttavat tulokseen vähemmän kuin tiedot, joiden varianssi on pieni.

49. Samalla tavalla lasketaan painotettu keskihajonta. Se kuvaa P_{ow}-mittauksen toistettavuutta. Jos painotetun keskihajonnan arvo on pieni, se tarkoittaa, että P_{ow}-arvon määrittämisen toistettavuus oli hyvä yhdessä laboratoriossa. Tietojen muodollista tilastollista käsittelyä selostetaan jäljempänä.

▼M4

Tulosten käsittely

Tasapainotilan saavuttamisen osoittaminen

50. Testiaineen pitoisuuden suhteen logaritmi 1-oktanolissa ja vedessä (log (C_O/C_w)) lasketaan jokaiselta näytteenottokerralta. Kemiallisen tasapainotilan saavuttaminen osoitetaan esittämällä tämä suhde aikaan nähden. Tässä esitystavassa tasanne, joka perustuu vähintään neljään peräkkäiseen aikapisteeseen, osoittaa, että tasapainotila on saavutettu ja että yhdiste on liuennut 1-oktanoliin. Jos näin ei ole, testiä on jatkettava, kunnes neljä peräkkäistä aikapistettä antavat tulokseksi kulmakertoimen, joka ei eroa nollasta huomattavasti p-tason ollessa 0,05, mikä tarkoittaa sitä, että log C_o/C_w ei riipu ajasta.

Log P_{ow} -arvon laskeminen

51. Kokeellisen yksikön log P_{ow} -arvo lasketaan log C_o/C_w -arvon painotettuna keskiarvona log C_o/C_w -käyrän osalle siihen aikaan nähden, jonka osalta tasapainotila on osoitettu saavutetuksi. Painotettu keskiarvo lasketaan painottamalla tietoja varianssin käänteisluvulla, jotta tietojen vaikutus lopputulokseen on käänteisessä suhteessa tietojen epävarmuuteen.

Log P_{ow} -arvon keskiarvo

52. Eri kokeellisten yksiköiden log P_{ow} -arvojen keskiarvo lasketaan yksittäisten kokeellisten yksikköjen tulosten, joita on painotettu niiden variansseilla, keskiarvona.

Keskiarvo lasketaan seuraavan kaavan mukaan:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

jossa

$\log P_{OW,i}$ = yksittäisen kokeellisen yksikön i log P_{ow} -arvo

$\log P_{OW,Av}$ = yksittäisten log P_{ow} -arvojen painotettu keskiarvo

w_i = kokeellisen yksikön I log P_{ow}-arvolle osoitettu tilastollinen paino.

Log $P_{OW,i}$ -arvon varianssin käänteislukua käytetään muodossa w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Log P_{ow} -arvojen keskiarvon virhe arvioidaan yksittäisten kokeellisten yksiköiden tasapainotilan saavuttamisen vaiheessa määritetyn log C_o/C_w -arvon toistettavuutena. Se ilmaistaan log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$) -arvon painotettuna keskihajontana, joka taas on log $P_{OW,Av}$ -arvoon liittyvän virheen mitta. Painotettu keskihajonta voidaan laskea painotetusta varianssista ($var_{\log Pow,Av}$) seuraavasti:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Symboli n tarkoittaa kokeellisten yksiköiden lukumäärää.

▼M4

Testiraportti

54. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testiaine:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava (josta käy ilmi leiman sijainti käytettäessä radioaktiivista merkkiainetta) ja merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (katso 17 kohta)

— testiaineen puhtaus (epäpuhtaudet)

— merkkiaineella leimatun kemikaalin leiman puhtaus ja molaarinen aktiivisuus (tapauksen mukaan)

— alustava arvio log P_{ow} -arvosta sekä arvon johtamisesssa käytetty menetelmä.

Testiolosuhteet:

— testien suorituspäivämäärät

— lämpötila testin aikana

— 1-oktanolin ja veden tilavuudet testin alussa

— otettujen 1-oktanoli- ja vesinäytteiden tilavuudet

— 1-oktanolin ja veden jäljelle jääneet tilavuudet testiastioissa

— käytettyjen testiastioiden ja sekoitusolosuhteiden kuvaus (sekoitussauvan ja testiastian geometria, vortex-ilmiön korkeus millimetreinä ja sekoitusnopeus, jos saatavilla)

— testiaineen ja määritysrajan määrittämisessä käytetyt analyysimenetelmät

— näytteenottokertojen määrä

— vesifaasin ja käytettyjen puskuriliuosten pH, kun pH:ta on muutettu ionisoituneita molekyylejä varten

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

Tulokset:

— käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus ja herkkyys

— testiaineen määritetyt pitoisuudet 1-oktanolissa ja vedessä ajan funktiona

— massataseen osoittaminen

— lämpötila ja keskihajonta tai lämpötilan vaihteluväli kokeen aikana

— pitoisuussuhteen regressio ajan suhteen

— keskiarvo log $P_{ow,Av}$ ja sen keskivirhe

— tulosten pohdinta ja tulkinta

▼M4

— esimerkkejä edustavan analyysin mittaustuloksista (kaikki mittaustulokset on tallennettava hyvää laboratoriokäytäntöä koskevien periaatteiden mukaisesti), mukaan luettuina surrogaattien saannot, sekä kalibroinnissa käytettyjen tasojen määrä (ja kalibrointikäyrän korrelaatiokerrointa koskevat kriteerit) ja laadunvarmistuksen/laadunvalvonnan tulokset

— jos saatavilla: koemenettelyn validointiraportti (merkitään kirjallisuusviitteisiin).

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the ”slow-stirring” method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499–512.

2) Tämän liitteen luku A.8 Jakaantumiskerroin.

3) Tämän liitteen luku A.8 Jakaantumiskerroin.

4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596–2602.

9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

10) Tämän liitteen luku A.6 Vesiliukoisuus.

11) Tämän liitteen luku C.7 Hajoaminen – Abioottinen hajoaminen: Hydrolyysi pH:n funktiona.

12) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys – Osat II–VII (menetelmät A–F).

13) Tämän liitteen luku A.4 Höyrynpaine.

14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623–626.

15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2–1 ja 2–52.

16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479–488.

22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386–390.

▼M4

Lisäys 1

Laskentataulukko: sellaisten testiaineiden, joilla on erilaiset log P_{OW} -arvot vesifaasissa, havaitsemisessa tarvittavien vähimmäisvesimäärien laskeminen

Oletukset:

— Yksittäisten alikvoottien enimmäistilavuus = 10 prosenttia kokonaistilavuudesta, viisi alikvoottia = 50 prosenttia kokonaistilavuudesta.

— Testiaineiden pitoisuus= 0,7 × liukoisuus kummassakin faasissa. Jos pitoisuudet ovat alhaisempia, on käytettävä suurempia määriä.

— Havaitsemisrajan määrityksessä käytetty tilavuus = 100 ml.

— log P_{ow} vs. log S_w ja log P_{ow} vs. SR (S_{oct}/S_w) edustavat testiaineiden suhteita riittävästi.

Estimaatti S_w

log P_{ow}	Kaava	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,887	1,297E-01
6	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,809	1,552E-02
7	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,731	1,858E-03
8	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 3,192	6,427E-04

Estimaatti S_{oct}

log P_{ow}	Kaava	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$	2.710E+05

▼**M4**

Testiaineen kokonaismassa (mg)	$Mass_{oct}/Mass_{water}$	$Mass_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Mass_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Tilavuuksien laskeminen

H_2O-faasiin tarvittava vähimmäistilavuus kussakin LOD-pitoisuudessa

$\log K_{ow}$	LOD (mikrogrammaa/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
LOD:n yhteydessä käytetty tilavuus (l)	0,1					

Laskentaohjeet

Edustaa alle 10:tä prosenttia vesifaasin kokonaistilavuudesta, 1 litran tasapainotusastia.

Edustaa alle 10:tä prosenttia vesifaasin kokonaistilavuudesta, 2 litran tasapainotusastia.

Edustaa alle 10:tä prosenttia vesifaasin kokonaistilavuudesta, 5 litran tasapainotusastia.

Edustaa alle 10:tä prosenttia vesifaasin kokonaistilavuudesta, 10 litran tasapainotusastia.

Ylittää 10 prosenttia myös 10 litran tasapainotusastian yhteydessä.

▼**M4**

Yhteenveto tarvittavista tilavuuksista vesiliukoisuuden ja log P_{ow} -arvon funktiona

H_2O-faasiin tarvittava vähimmäistilavuus kussakin LOD-pitoisuudessa (ml)

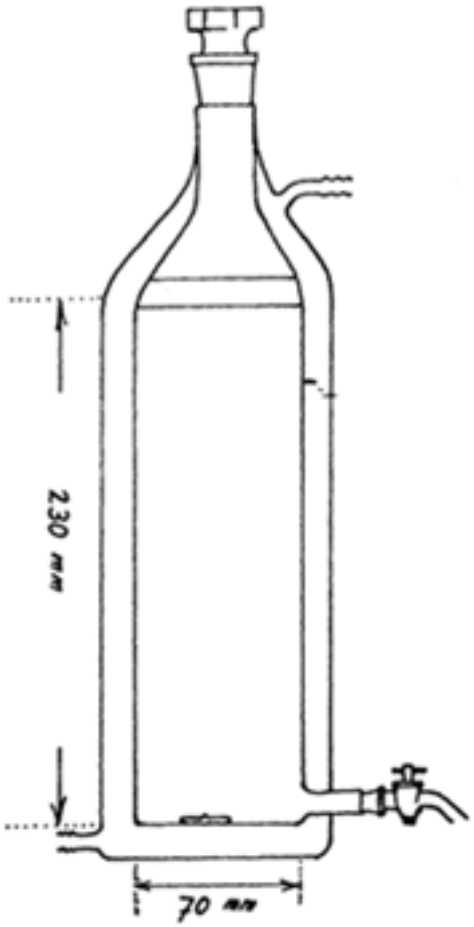
log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogrammaa/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogrammaa/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
LOD:n yhteydessä käytetty tilavuus (l)		0,1					

Lisäys 2

Esimerkki lasisesta testiastiasta P_{OW} -arvon määrittämistä varten tarkoitettuun hitaan sekoituksen kokeeseen



▼B

OSA B: TOKSISUUDEN JA MUIDEN TERVEYSVAIKUTUSTENMÄÄRITYS

SISÄLLYSLUETTELO

YLEISJOHDANTO

B.1 a. AKUUTTI ORAALINEN TOKSISUUS — VAKIOANNOSMENETELMÄ

B.1 b. AKUUTTI ORAALINEN TOKSISUUS — AKUUTIN TOKSISUUSLUOKAN MENETELMÄ

B.2. AKUUTTI MYRKYLLISYYS (HENGITETTYNÄ)

B.3. AKUUTTI MYRKYLLISYYS (IHON KAUTTA)

B.4. AKUUTTI TOKSISUUS: IHOÄRSYTTÄVYYS/-SYÖVYTTÄVYYS

B.5. AKUUTTI TOKSISUUS: SILMÄN ÄRSYTTÄVYYS/SYÖVYTTÄVYYS

B.6. IHON HERKISTYMINEN

B.7. ORAALINEN TOISTUVAN ANNOSTELUN TOKSISUUSTUTKIMUS (28 PV) JYRSIJÖILLÄ

B.8. SUBAKUUTTI MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ: 28 PÄIVÄN TUTKIMUS

B.9. TOISTETUN ANNOKSEN (28 PÄIVÄÄ) MYRKYLLISYYS (IHON KAUTTA NAUTITTAVAT AINEET)

B.10. MUTAGEENISUUS — KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI NISÄKÄSSOLUILLA *IN VITRO*

B.11. MUTAGEENISUUS — KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI NISÄKKÄIDEN LUUYTIMESSÄ *IN VIVO*

B.12. MUTAGEENISUUS — MIKROTUMATESTI NISÄKKÄÄN PUNASOLUISSA *IN VIVO*

B.13/14. MUTAGEENISUUS — TAKAISINMUTAATIOTESTI BAKTEEREILLA

B.15. MUTAGEENISUUSTESTAUS JA KARSINOGEENISTEN AINEIDEN SEULONTA GEENIMUTAATIOT — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.16. MITOOTTINEN REKOMBINAATIO — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE.*

B.17. MUTAGEENISUUS — GEENIMUTAATIOTESTI NISÄKÄSSOLUILLA *IN VITRO*

B.18. DNA-VAURIO JA SEN KORJAANTUMINEN — UDS-TESTI NISÄKÄSSOLUVILJELMÄLLÄ

B.19. SISARKROMATIDIVAIHDOSTESTI

B.20. RESESSIIVI LETAALI -TESTI BANAANIKÄRPÄSELLÄ *(DROSOPHILIA MELANOGASTER)*

▼B

B.21.	SOLUTRANSFORMAATIOTESTIT NISÄKÄSSOLUVILJELMILLÄ
B.22.	DOMINOIVA LETAALITESTI JYRSIJÖILLÄ
B.23.	NISÄKKÄIDEN SPERMATOGONIOIDEN KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI
B.24.	HIIREN SPOT-TESTI
B.25.	HIIREN PERIYTYVÄ TRANSLOKAATIO
B.26.	SUBKROONINEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTESTI TOISTETUILLA ANNOKSILLA TEHTÄVÄ 90 VUOROKAUDEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS JYRSIJÖILLÄ
B.27.	SUBKROONINEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTESTI TOISTETUILLA ANNOKSILLA TEHTÄVÄ 90 VUOROKAUDEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS MUILLA KUIN JYRSIJÖILLÄ
B.28.	SUBKROONINEN MYRKYLLISYYSTESTI (IHON KAUTTA) TOISTUVA ANNOSTELU IHON KAUTTA, 90 VUOROKAUTTA, JYRSIJÄT
B.29.	SUBKROONINEN MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ: 90 PÄIVÄN TUTKIMUS
B.30.	KROONISET MYRKYLLISYYSTUTKIMUKSET
B.31.	PRENATAALISEN KEHITYKSEN AIKAISTEN MYRKYLLISYYSVAIKUTUSTEN TUTKIMUS
B.32.	KARSINOGEENISUUSTUTKIMUKSET
B.33.	YHDISTETTY KROONINEN MYRKYLLISYYS-/KARSINOGEENISUUSTUTKIMUS
B.34.	MYRKKYJEN VAIKUTUS LISÄÄNTYMISKYKYYN (YHDEN SUKUPOLVEN TESTI)
B.35.	KAKSI SUKUPOLVEA KÄSITTÄVÄ LISÄÄNTYMISKYKYYN KOHDISTUVIEN MYRKYLLISYYSVAIKUTUSTEN TUTKIMUS
B.36.	TOKSIKOKINETIIKKA
B.37.	ORGANOFOSFAATTIEN AIHEUTTAMA VIIVÄSTYNYT NEUROTOKSISUUS AKUUTIN ALTISTUKSEN JÄLKEEN
B.38.	ORGANOFOSFAATTIEN AIHEUTTAMA VIIVÄSTYNYT NEUROTOKSISUUS 28 PÄIVÄN TOISTUVAN ANNOSTELUN TUTKIMUKSESSA
B.39.	UDS-TESTI NISÄKKÄIDEN MAKSASOLUILLA *IN VIVO*
B.40.	*IN VITRO* IHOSYÖVYTTÄVYYS: IHON SÄHKÖVASTUSMÄÄRITYSTESTI (TER)
B.40 a.	*IN VITRO* IHOSYÖVYTTÄVYYS: IHMISIHOMALLITESTI

▼**B**

B.41. *IN VITRO* 3T3 NRU — VALOMYRKYLLISYYSTESTI

B.42. IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYS-MENETELMÄ

B.43. NEUROTOKSISUUSTUTKIMUS JYRSIJÖILLÄ

B.44. IHON KAUTTA IMEYTYMINEN: *IN VIVO* -MENETELMÄ

B.45. IHON KAUTTA IMEYTYMINEN: *IN VITRO* -MENETELMÄ

B.46. *IN VITRO* -IHOÄRSYTTÄVYYS: REKONSTRUOIDUN IHMISORVASKEDEN TESTIMENETELMÄ

B.47. NAUDAN SARVEISKALVON SAMEUTEEN JA LÄPÄISEVYYTEEN PERUSTUVA TESTIMENETELMÄ SILMÄÄ SYÖVYTTÄVIEN JA SILMÄÄ VAKAVASTI ÄRSYTTÄVIEN AINEIDEN TUNNISTAMISEKSI

B.48. ERISTETTYÄ KANAN SILMÄÄ KÄYTTÄVÄ TESTIMENETELMÄ SILMÄÄ SYÖVYTTÄVIEN JA SILMÄÄ VAKAVASTI ÄRSYTTÄVIEN AINEIDEN TUNNISTAMISEKSI

B.49. *IN VITRO* -MIKROTUMATESTI NISÄKÄSSOLUILLA

B.50. IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYS-MENETELMÄ: DA

B.51. IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYS-MENETELMÄ: BRDU-ELISA

▼**M4**

B.52. AKUUTTI MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ – AKUUTIN TOKSISUUSLUOKAN MENETELMÄ

▼B

YLEISJOHDANTO

A. TESTIAINEEN KARAKTERISAATIO

Testiaineen koostumus, mukaan lukien tärkeimmät epäpuhtaudet, ja sen olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, mukaan lukien stabiliteetti, on oltava tiedossa ennen toksisuustutkimusten aloittamista.

Testiaineen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet antavat tärkeää tietoa antotavan, tutkimusasetelman ja testiaineen käsittely- ja säilyttämistavan valintaa varten.

Annosteluaineessa ja biologisessa materiaalissa olevan testiaineen (ja mahdollisuuksien mukaan myös tärkeimpien epäpuhtauksien) määrittämiseen käytettävä määrällinen ja laadullinen analyysimenetelmä tulee kehittää ennen tutkimuksen aloittamista.

Kaikki testiaineen tunnistamiseen, fysikaalis-kemiallisiin ominaisuuksiin, puhtauteen ja käyttäytymiseen liittyvät tiedot tulee sisällyttää tutkimusraporttiin.

B. ELÄINTEN HOITO

Ympäristöolosuhteiden ja eläinten oikeiden hoitomenetelmien tiukka seuranta on oleellista toksisuustutkimuksissa.

i) *Elinolosuhteet*

Koe-eläintilojen ja häkkien ympäristöolosuhteiden on oltava testattavalle lajille tarkoituksenmukaiset. Rotalle, hiirelle ja marsulle sopiva huoneenlämpötila on 22 ± 3 °C ja suhteellinen ilmankosteus 30-70 %. Kaniineille sopiva huoneenlämpötila on 20 ± 3 °C ja suhteellinen ilmankosteus 30–70 %.

Jotkut tutkimusmenetelmät ovat erityisen herkkiä lämpötilavaikutuksille. Näissä tapauksissa asianmukaiset olosuhteet on selostettu yksityiskohtaisesti tutkimusmenetelmän kuvauksen yhteydessä. Kaikissa toksisuustutkimuksissa on valvottava huoneenlämpötilaa ja ilmankosteutta, rekisteröitävä tiedot ja kirjattava ne tutkimuksen loppuraporttiin.

Valaistuksen tulee olla keinovaloa. Eläimen tulee saada olla 12 tuntia valossa ja 12 tuntia pimeässä. Valaistusmallin yksityiskohdat on rekisteröitävä ja kirjattava tutkimuksen loppuraporttiin.

Jollei menetelmässä erikseen muuta mainita, eläimiä voidaan säilyttää yksin tai pienryhmänä häkeissä, joissa on samaa sukupuolta. Yhdessä ryhmähäkissä saa olla enintään viisi eläintä.

Koe-eläintutkimusraporteissa on tärkeää ilmoittaa käytetty häkkityyppi ja eläinten määrä häkkiä kohti sekä kemiallisen altistuksen että sitä seuranneiden havainnointijaksojen aikana.

▼B

ii) *Ruokintaolosuhteet*

Ravinnon tulee tyydyttää testattavan eläinlajin kaikki ravitsemukselliset tarpeet. Jos testiainetta annetaan eläimille ravinnossa, ravinnon ravintoarvo voi heiketä testiaineen ja ruoka-aineen interaktion vuoksi. Tällaisen reaktion mahdollisuus on otettava huomioon tutkimustuloksia tulkittaessa. Eläimille voidaan antaa tavanomaista koe-eläinravintoa ja juomavettä on oltava kaiken aikaa tarjolla. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa testiaineelle sopiva sekoitus, kun se annostellaan ravinnon mukana.

Ravintoa saastuttavia aineita, joiden tiedetään vaikuttavan toksisuuteen, ei saa olla läsnä häiritsevinä pitoisuuksina.

C. **VAIHTOEHTOISET TUTKIMUKSET**

Euroopan unioni on sitoutunut edistämään sellaisten vaihtoehtomenetelmien kehittämistä ja validointia, joista saadaan samantasoista tietoa kuin nykyisistä eläinkokeista, mutta joihin tarvitaan vähemmän eläimiä ja jotka aiheuttavat vähemmän kärsimystä tai joissa eläimiä ei tarvita lainkaan.

Sitä mukaa kuin tällaisia menetelmiä tulee saataville, on niitä mahdollisuuksien mukaan käytettävä vaaran luonnehdinnassa ja siihen perustuvassa ominaisvaarojen luokittelussa ja merkitsemisessä.

D. **ARVIONTI JA TULKINTA**

Testien arvioinnissa ja tulkinnassa on otettava huomioon ekstrapolaatiorajoitukset eläinkokeiden ja *in vitro* -tutkimusten tulosten soveltamisessa suoraan ihmiseen, ja siksi mahdollisesti saatavia todisteita haittavaikutuksista ihmisellä voidaan käyttää tutkimustulosten vahvistamiseen.

E. **LÄHDELUETTELO**

Useimmat näistä menetelmistä on kehitetty OECD:n ”Testing Guidelines” -ohjelman puitteissa ja niitä tulisi käyttää yhtenevästi GLP (Good Laboratory Practice) -periaatteiden kanssa mahdollisimman laajan ”keskinäisen tietojen hyväksymisen” varmistamiseksi.

Lisätietoa löytyy OECD-ohjeiston kirjallisuusluettelossa mainituista lähteistä ja muusta asiaankuuluvasta kirjallisuudesta.

▼B

B.1 a. **AKUUTTI ORAALINEN TOKSISUUS — VAKIOANNOS-MENETELMÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro TG 420 (2001)

1.1 JOHDANTO

Perinteisissä menetelmissä akuutin toksisuuden arvioimiseksi käytetään päätepisteenä eläinten kuolemaa. Vuonna 1984 British Toxicology Society ehdotti akuutin toksisuuden testaamiseksi uutta käytäntöä, joka perustuu aineen annosteluun vakioannostasojen sarjana (1). Menetelmässä vältettiin käyttämästä eläinten kuolemaa päätepisteenä ja tarkkailtiin sen sijaan selviä toksisuusoireita yhdellä annossarjasta valitulla vakioannostasolla. Menetelmä on hyväksytty tutkimusmenetelmäksi vuonna 1992 Yhdistyneen kuningaskunnan (2) ja kansainvälisten (3) *in vivo* -validointitutkimusten perusteella. Tämän jälkeen vakioannosmenetelmän tilastollisia ominaisuuksia on arvioitu matemaattisten mallien avulla useissa tutkimuksissa (4) (5) (6). *In vivo*- ja mallintamistutkimukset ovat osoittaneet, että menetelmä on toistettava, että siinä käytetään vähemmän eläimiä ja että se aiheuttaa vähemmän kärsimystä kuin perinteiset menetelmät. Menetelmällä voidaan luokitella aineita vaarallisuuden mukaan samalla tavoin kuin muilla akuutin toksisuuden tutkimusmenetelmillä.

Ohjeita tiettyyn tarkoitukseen sopivimman tutkimusmenetelmän valinnasta on annettu akuutin oraalisen toksisuuden testausta koskevassa ohjeasiakirjassa (Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (7)). Ohjeasiakirjassa on myös lisätietoa tutkimusmenetelmä B.l a:n käyttämisestä ja tulkinnasta.

Menetelmän periaatteena on, että päätutkimuksessa käytetään ainoastaan lievästi toksisia annoksia ja että todennäköisesti tappavien annosten antamista vältetään. Annoksia, joiden tiedetään aiheuttavan voimakasta kipua ja kärsimystä syövyttävien tai vaikea-asteisten ärsytysvaikutusten vuoksi, ei myöskään tarvitse annostella. Kuolemaisillaan olevat, selvästi kärsivät tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla, ja koetulosten tulkinnassa ne on otettava huomioon samalla tavalla kuin kokeessa kuolleet eläimet. Erillisessä ohjeasiakirjassa (8) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

Menetelmällä saadaan tietoa vaarallisista ominaisuuksista ja aineet voidaan sen perusteella sijoittaa ja luokitella akuuttia toksisuutta aiheuttavien kemikaalien kansainvälisesti yhdenmukaistetun luokitusjärjestelmän mukaisesti (Globally Harmonised System (GHS) for the classification of chemicals which cause acute toxicity (9)).

Koelaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen suorittamista. Näissä tiedoissa on esitettävä aineen tunnistetiedot ja kemiallinen rakenne, sen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kaikkien muiden aineella *in vivo* tai *in vitro* suoritettujen toksisuuskokeiden tulokset, rakenteellisesti samanlaisten aineiden toksikologiset tiedot ja aineen odotettu käyttö. Nämä tiedot ovat välttämättömiä kaikkien asianosaisten vakuuttamiseksi siitä, että kokeella on merkitystä ihmisten terveyden suojelun kannattaja että sen avulla voidaan valita sopiva alkuannos.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT

Akuutti oraalinen toksisuus: haittavaikutukset, joita esiintyy, kun ainetta on annosteltu suun kautta kerta-annoksena tai useampana annoksena 24 tunnin aikana.

Viivästynyt kuolema: eläin ei kuole tai vaikuta kuolevalta 48 tunnin kuluessa, mutta kuolee myöhemmin 14 päivän havainnointijakson aikana.

Annos: annostellun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esimerkiksi mg/kg).

Ilmeinen toksisuus: yleistermi, jolla tarkoitetaan testiaineen antamisen jälkeen ilmeneviä selviä toksisuuden oireita (katso esimerkiksi (3)). Näiden oireiden perusteella vakioannoksen suurentaminen seuraavaan annokseen aiheuttaisi todennäköisesti voimakasta kipua ja jatkuvia merkkejä kovasta kärsimyksestä tai sen, että eläin on kuolemaisillaan (perusteet on esitetty eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa ohjeasiakirjassa Humane Endpoints Guidance Document (8)) tai todennäköisesti useimpien eläinten kuoleman.

GHS: Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (Kemiallisten aineiden ja seosten kansainvälisesti yhdenmukaistettu luokitusjärjestelmä). Yhteinen toimi, johon osallistuvat OECD (ihmisten terveys ja ympäristö), YK:n vaarallisten aineiden kuljettamista käsittelevä asiantuntijakomitea (fysikaalis-kemialliset ominaisuudet) ja ILO (vaarojen ilmoittaminen) ja jota koordinoidaan kemikaalien järkevää hallinnointia koskevalla organisaatioiden välisellä ohjelmalla (IOMC).

Uhkaava kuolema: eläin on vakavasti sairas tai kuolee todennäköisesti ennen seuraavaa suunniteltua havainnointiajankohtaa. Jyrsijöillä tällaista tilaa osoittavia merkkejä voivat olla kouristukset, kyljellään makaaminen, velttous ja vapina. (Katso tarkempia tietoja eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevasta ohjeasiakirjasta (8)).

LD_{50} (median lethal dose, keskimääräinen tappava annos): on tilastollinen kerta-annos, jonka voidaan suun kautta annosteltuna odottaa tappavan puolet annoksen saaneista eläimistä. LD_{50}-arvo ilmoitetaan testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (mg/kg).

Raja-annos: kokeen yläraja-annos (2 000 tai 5 000 mg/kg).

Kuolemaisillaan oleva: eläin, joka on kuolemaisillaan tai ei kykene säilymään hengissä hoidosta huolimatta. (Katso tarkempia lisätietoja eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevasta ohjeasiakirjasta (8)).

Ennustettava kuolema: sellaisten kliinisten oireiden esiintyminen, jotka viittaavat siihen, että eläin tulee kuolemaan tietyn ajan kuluttua ennen kokeen suunniteltua päättymistä. Näitä oireita ovat esimerkiksi kykenemättömyys käyttää vettä tai ruokaa. (Katso tarkempia lisätietoja eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevasta ohjeasiakirjasta (8)).

▼B

1.3 KOEMENETELMÄN PERIAATE

Samaa sukupuolta olevien eläinten ryhmille annostellaan testiainetta vaiheittain käyttämällä 5, 50, 300 ja 2 000 mg:n/kg vakioannoksia (poikkeuksellisesti voidaan käyttää 5 000 mg:n/kg lisävakioannosta, katso kappale 1.6.2). Alkuannostaso valitaan esikokeen perusteella annokseksi, jonka odotetaan aiheuttavan joitakin toksisuusoireita, mutta ei kuitenkaan vakavia toksisia vaikutuksia tai kuolleisuutta. Kipuun, kärsimykseen ja uhkaavaan kuolemaan liittyviä kliinisiä oireita ja tiloja on kuvailtu yksityiskohtaisesti OECD:n ohjeasiakirjassa (8). Muille eläinryhmille voidaan antaa korkeampia tai matalampia vakioannoksia sen mukaan, esiintyykö merkkejä toksisuudesta tai kuolleisuudesta. Menettelyä jatketaan, kunnes ilmeistä toksisuutta tai korkeintaan yhden kuoleman aiheuttava annos pystytään määrittämään, tai kun korkeimmasta annoksesta ei ole havaittavissa vaikutuksia tai alhaisin annos aiheuttaa kuolemia.

1.4 KOEMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Eläinlajin valinta**

Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, tosin muitakin jyrsijöitä voidaan käyttää. Yleensä käytetään naaraita (7). Syynä tähän on, että tavanomaisia LD_{50}-kokeita koskevien kirjallisuustutkimusten perusteella sukupuolten herkkyydessä on yleensä vähän eroja, mutta silloin kun eroja on havaittu, naaraat ovat yleensä hieman herkempiä (10). Mikäli rakenteellisesti samanlaisten kemikaalien toksikologisia ja toksikokineettisiä ominaisuuksia koskevat tiedot osoittavat urosten olevan herkempiä, on käytettävä uroksia. Kokeen tekeminen uroksilla edellyttää riittäviä perusteita.

Kokeeseen on käytettävä terveitä, nuoria ja täysikasvuisia yleisesti käytettyjä koe-eläinkantoja. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä kantavia. Kunkin eläimen on annostuksensa alussa oltava 8-12 viikon ikäinen, ja sen paino saa poiketa korkeintaan ± 20 % aikaisemmin annoksen saaneiden eläinten keskipainosta.

1.4.2 **Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta**

Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittävät vaatimukset suhteellisen kosteuden suhteen ovat vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Eläimet voidaan erotella eri häkkeihin annoksen mukaan, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia.

1.4.3 **Eläinten valmistelu**

Eläimet valitaan satunnaisesti ja merkitään yksilötunnistusta varten. Eläimiä pidetään häkeissään vähintään viiden päivän ajan ennen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-oloihin.

▼B

1.4.4 **Annosten valmistelu**

Yleensä testiaineen testattavat annokset annostellaan vakiotilavuudessa niin, että annosteltavan valmisteen pitoisuus vaihtelee. Testattaessa nestemäistä lopputuotetta tai sekoitusta testiaineen käyttö laimentamattomana eli vakiopitoisena saattaa kuitenkin olla oleellista kyseisen aineen myöhemmän riskinarvioinnin kannalta, ja jotkut sääntelyviranomaiset edellyttävätkin tällaista menettelyä. Kummassakaan tapauksessa annoksen enimmäistilavuutta ei saa ylittää. Kerralla annettavan nesteen enimmäismäärä riippuu koe-eläimen koosta. Jyrsijöillä määrä ei yleensä saa olla yli 1 ml sataa painogrammaa kohti. Vesiliuoksia voidaan kuitenkin antaa 2 ml sataa painogrammaa kohti. Annostellun valmisteen koostumukseksi suositellaan vesipitoista liuosta/suspensiota/emulsiota aina, kun se on mahdollista. Muussa tapauksessa on mieluiten käytettävä öljypohjaista (esimerkiksi maissiöljy) liuosta/suspensiota/emulsiota tässä järjestyksessä ja sen jälkeen muihin kantaja-aineisiin pohjautuvia liuoksia. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen toksiset ominaisuudet on tunnettava. Annokset on valmistettava vähän ennen annostelua paitsi, jos valmisteen tiedetään säilyttävän stabiliteettinsa käytön ajan ja sen on osoitettu olevan hyväksyttävä.

1.5 TESTIN SUORITUS

1.5.1 **Annostelu**

Testiaine annetaan kerta-annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Mikäli kerta-annostelu ei poikkeuksellisesti ole mahdollinen, annos voidaan antaa pienempinä osina enintään 24 tunnin kuluessa.

Eläimiä ei saa ruokkia ennen annostelua (esimerkiksi rottaa on pidettävä ruoatta yli yön ja hiirtä 3–4 tuntia, mutta vettä tulee olla tarjolla). Paaston jälkeen eläimet punnitaan ja niille annetaan testiaine. Aineen annostelun jälkeen ruokintaa voidaan siirtää rotilla vielä 3–4 tuntia ja hiirillä 1–2 tuntia. Mikäli annos annetaan osina tietyn ajan kuluessa, eläimille saatetaan joutua antamaan ruokaa ja vettä jakson pituudesta riippuen.

1.5.2 **Esikoe**

Esikokeen tarkoituksena on sopivan alkuannoksen valinta päätutkimusta varten. Testiaine annostellaan yksittäisille eläimille vaiheittain liitteessä 1 esitetyn toimenpidekaavion mukaisesti. Esikoe on valmis, kun päätös päätutkimuksessa käytettävästä alkuannoksesta voidaan tehdä (tai jos kuolleisuutta ilmenee alhaisimman vakioannoksen yhteydessä).

Esikokeen alkuannos valitaan vakioannostasoista 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kg. Valitun alkuannoksen odotetaan aiheuttavan ilmeistä toksisuutta ja sen on mahdollisuuksien mukaan perustuttava samalla kemikaalilla tai rakenteellisesti samanlaisilla kemikaaleilla suoritettujen *in vivo*- tai *in vitro* -testien tietoihin. Jos tällaisia tietoja ei ole käytettävissä, alkuannos on 300 mg/kg.

Annokset annetaan eläimille vähintään 24 tunnin välein. Kaikkia eläimiä on havainnoitava vähintään 14 päivää.

▼B

Korkeinta 5 000 mg:n/kg vakioannostasoa voidaan käyttää poikkeuksellisesti ja vain silloin, kun se on perusteltua erityisten sääntelyyn liittyvien vaatimusten vuoksi (katso liite 3). Eläinten hyvinvoinnin takia eläinkokeiden tekeminen GHS-luokassa 5 annoksella 2 000–5 000 mg/kg ei ole suositeltavaa, ja sitä tulee käyttää vain, kun on erittäin todennäköistä, että tällaisen kokeen tuloksilla on välitöntä merkitystä eläinten tai ihmisten terveyden tai ympäristön suojelemiselle.

Kun esikokeessa alhaisimmalla vakioannostasolla (5mg/kg) testattu eläin kuolee, tavanomainen menettely on päättää tutkimus ja luokitella aine GHS-luokkaan 1 (kuten liitteessä 1 on esitetty). Mikäli luokitus on kuitenkin vielä varmennettava, voidaan suorittaa seuraavanlainen vaihtoehtoinen lisätoimenpide: Toiselle eläimelle annetaan 5 mg:n/kg annos. Mikäli eläin kuolee, vahvistetaan luokitukseksi GHS-luokka 1 ja tutkimus päätetään välittömästi. Mikäli eläin jää henkiin, annetaan korkeintaan kolmelle muulle eläimelle 5 mg:n/kg annos. Koska kuolleisuusriski on suuri, annostelun tulee tapahtua vaiheittain eläinten hyvinvoinnin turvaamiseksi. Annokset on annettava eläimille riittävin aikavälein, jotta voidaan osoittaa edellisen eläimen todennäköisesti jäävän henkiin. Mikäli toinen eläin kuolee, annostelu keskeytetään välittömästi eikä enempää eläimiä testata. Koska toisen eläimen kuolema (riippumatta testattujen eläinten määrästä päättymishetkellä) kuuluu tulosluokkaan A (kaksi tai useampia eläimiä kuolee), noudatetaan 5 mg:n/kg vakioannokselle liitteessä 2 esitettyä luokitussääntöä (luokka 1 mikäli kaksi tai useampia eläimiä kuolee tai luokka 2 mikäli vain yksi eläin kuolee). Lisäksi liitteessä 4 annetaan ohjeita EU:n järjestelmän mukaisesta luokituksesta ennen uuden GHS-järjestelmän käyttöönottoa.

1.5.3 **Päätutkimus**

1.5.3.1 *Eläinten määrä ja annostasot*

Alkuannostasolla tapahtuneen testauksen jälkeen suoritettavat toimet on esitetty toimenpidekaavioissa liitteessä 2. Valittavana on kolme toimintavaihtoehtoa: testauksen keskeyttäminen ja sopivan vaarallisuusluokan määrittäminen, korkeamman vakioannoksen testaaminen tai matalamman vakioannoksen testaaminen. Eläinten suojelemiseksi päätutkimuksessa ei kuitenkaan käytetä uudestaan esikokeessa kuolemaan johtanutta annostasoa (katso liite 2). Kokemusten mukaan todennäköisin tulos alkuannostasolla on, että aine voidaan luokitella eikä uutta testausta tarvita.

Yleensä kullakin tutkitulla annostasolla käytetään yhteensä viittä samaa sukupuolta olevaa eläintä. Näihin viiteen eläimeen kuuluu yksi esikokeessa valitulla annostasolla testattu eläin sekä neljä muuta eläintä (paitsi jos päätutkimuksessa käytetty annostaso ei poikkeuksellisesti sisältynyt katsaustutkimukseen).

Annostelun aikaväli kullakin tasolla määritellään toksisten oireiden alkamishetken, keston ja vaikeusasteen mukaan. Seuraavan annoksen antamista tulee siirtää, kunnes jo annosteltujen eläinten eloonjäämisestä on saatu varmuus. Tarvittaessa annosteluväliksi suositellaan jokaisella annostasolla 3–4 päivää viivästyneen toksisuuden havainnoimiseksi. Aikaväliä voidaan muuttaa sopivaksi esimerkiksi, jos vasteesta ei vielä ole täyttä varmuutta.

▼B

Käytettäessä korkeinta 5 000 mg:n/kg vakioannosta on noudatettava liitteessä 3 esitettyä menettelytapaa (katso myös kappale 1.6.2).

1.5.3.2 *Raja-annostesti*

Raja-annostestiä käytetään pääasiassa silloin, kun tutkimuksen tekijällä on tietoa, jonka mukaan testiaine on todennäköisesti ei-toksinen, toisin sanoen se on toksista ainoastaan ylittäessään säädösten mukaiset raja-annokset. Tietoa testiaineen toksisuudesta saadaan samanlaisia testattuja yhdisteitä tai seoksia koskevista tiedoista, kun otetaan huomioon toksikologisesti merkittävien ainesosien tunnistetiedot ja prosenttiosuus. Päätutkimus on suoritettava, kun testiaineen toksisuudesta on vain vähän tai ei lainkaan tietoa tai kun se todennäköisesti on toksinen.

Näiden ohjeiden mukaisena raja-annostestinä voidaan tavanomaista menettelytapaa käytettäessä käyttää katsaustutkimusta, jossa alkuannos on 2 000 mg/kg (tai poikkeuksellisesti 5 000 mg/kg), ja jossa sen jälkeen annetaan neljälle muulle eläimelle sama annos.

1.6 HAVAINNOINTI

Eläimiä havainnoidaan yksittäin annostelun jälkeen vähintään yhden kerran ensimmäisten 30 minuutin aikana ja säännöllisin väliajoin ensimmäisten 24 tunnin aikana. Havainnoinnin on oltava erityisen tarkkaa ensimmäisten neljän tunnin aikana. Sen jälkeen havainnointi tapahtuu päivittäin 14 päivän ajan paitsi, jos eläin on poistettava tutkimuksesta ja lopetettava humaanilla tavalla eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi tai se löydetään kuolleena. Havainnoinnin kestoa ei pitäisi kuitenkaan määritellä tiukasti. Se tulee määrittää toksisten reaktioiden, niiden alkamishetken ja toipumisen keston perusteella ja sitä tulisi voida pidentää tarvittaessa. Toksisuusoireiden ilmaantumis- ja häviämisajankohdat ovat tärkeitä etenkin, jos toksisilla oireilla on taipumus viivästyä (11). Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti eläinkohtaisesti.

Lisähavainnointi on tarpeen jos eläinten toksisuusoireet jatkuvat. Havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, autonomisen hermoston ja keskushermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljenerityksen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa ohjeasiakirjassa esitetyt periaatteet ja perustelut on otettava huomioon (8). Kuolevat eläimet ja eläimet, jotka osoittavat merkkejä voimakkaasta kivusta ja jatkuvasta kovasta kärsimyksestä, tulee lopettaa humaanilla tavalla. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

1.6.1 **Ruumiinpaino**

Kunkin eläimen paino on määritettävä hieman ennen testiaineen annostelua ja vähintään viikoittain sen jälkeen. Painon muutokset on laskettava ja kirjattava. Kokeen päätyttyä henkiin jääneet eläimet punnitaan ja lopetetaan sen jälkeen humaanilla tavalla.

▼B

1.6.2 **Patologia**

Kaikki koe-eläimet (myös kokeen aikana kuolleet tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi tutkimuksesta poistetut) avataan. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata. Ensimmäisen annostelun jälkeen vähintään 24 tuntia hengissä säilyneiden eläinten makroskooppisia muutoksia sisältävät elimet voidaan myös tutkia mikroskooppisesti siitä mahdollisesti saatavan hyödyllisen tiedon vuoksi.

2. **TULOKSET**

Tuloksina on esitettävä yksittäisiä eläimiä koskevat tulokset. Kaikki tulokset tulee esittää myös yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin koeryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, toksisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 LOPPURAPORTTI

Loppuraportin tulee tarpeen mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (myös isomeroituminen),

— tunnistetiedot CAS-numero mukaan lukien.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— perustelut kantaja-aineen valinnalle, mikäli se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji ja -kanta,

— eläinten mikrobiologinen status, mikäli se on tiedossa,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli (tarvittaessa myös perusteet urosten käytölle naaraiden sijasta),

— lähde, ylläpito-olosuhteet, ravinto jne.

Koeolosuhteet:

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta, mukaan luettuna annostellun aineen fysikaalinen muoto,

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen annostelusta, mukaan luettuina annostelutilavuudet ja -ajankohta,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan lukien eläinrehun tyyppi/lähde, veden lähde),

— alkuannoksen valintaperusteet.

▼B

Tulokset:

— kunkin eläimen vastetulosten ja annostason taulukot (toksisuusoireet, mukaan lukien kuolleisuus, vaikutusten luonne, vaikeusaste ja kesto),

— ruumiinpainon ja siinä tapahtuneiden muutosten taulukot,

— kunkin eläimen paino annostelupäivänä, sen jälkeen viikon välein sekä kuolin- tai lopettamishetkellä,

— kuolinpäivä ja -ajankohta, mikäli eläin kuolee ennen suunniteltua lopettamista,

— kunkin eläimen toksisuusoireiden alkamisajankohta ja niiden mahdollinen palautuminen,

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla.

Tulosten tarkastelu ja tulkinta.

Johtopäätökset

4. **VIITTEET**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85–92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

(4) Whitehead, A. and Cumow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure.-Hum. Exp. Toxicol., 21, 183-196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

▼B

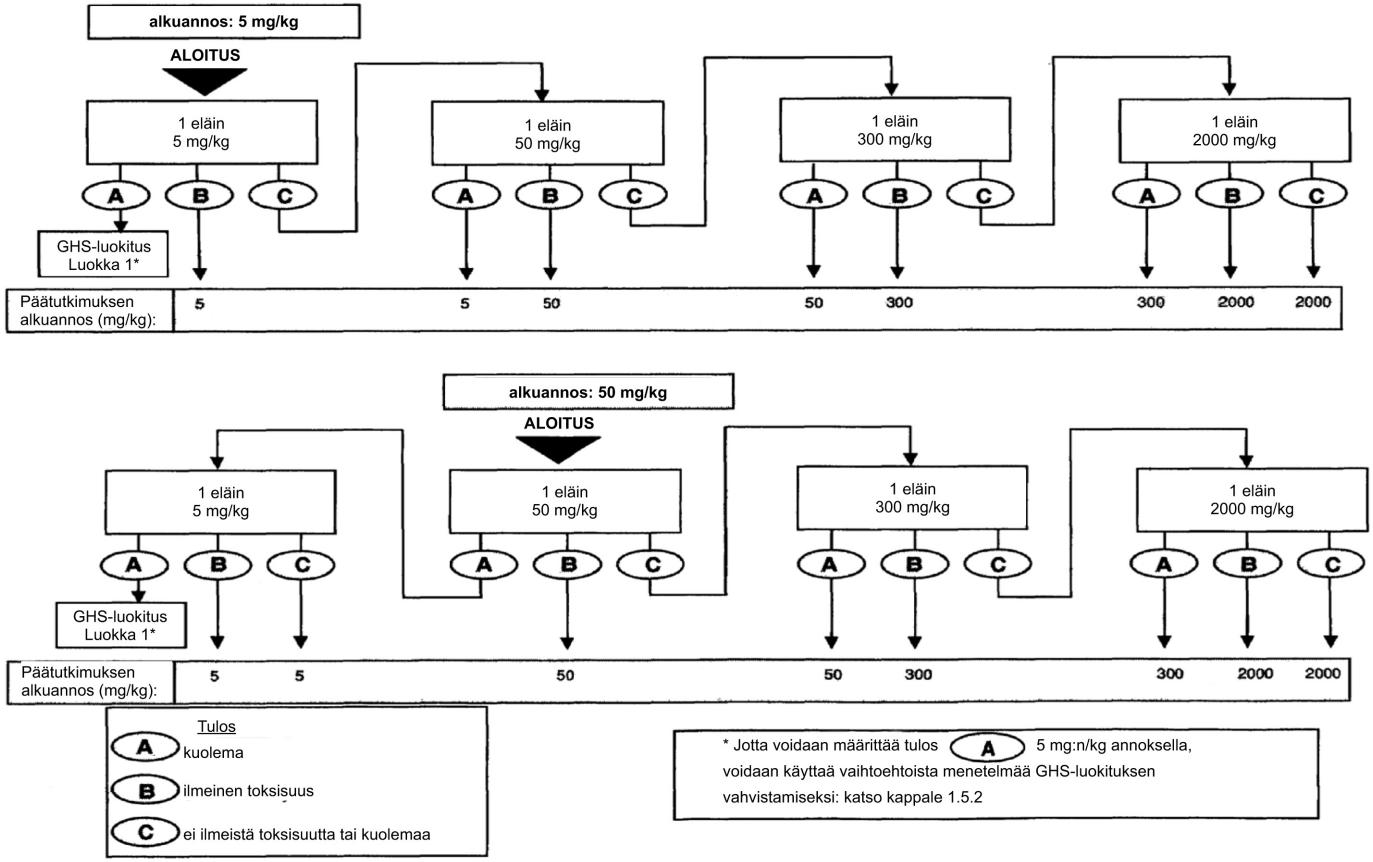
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

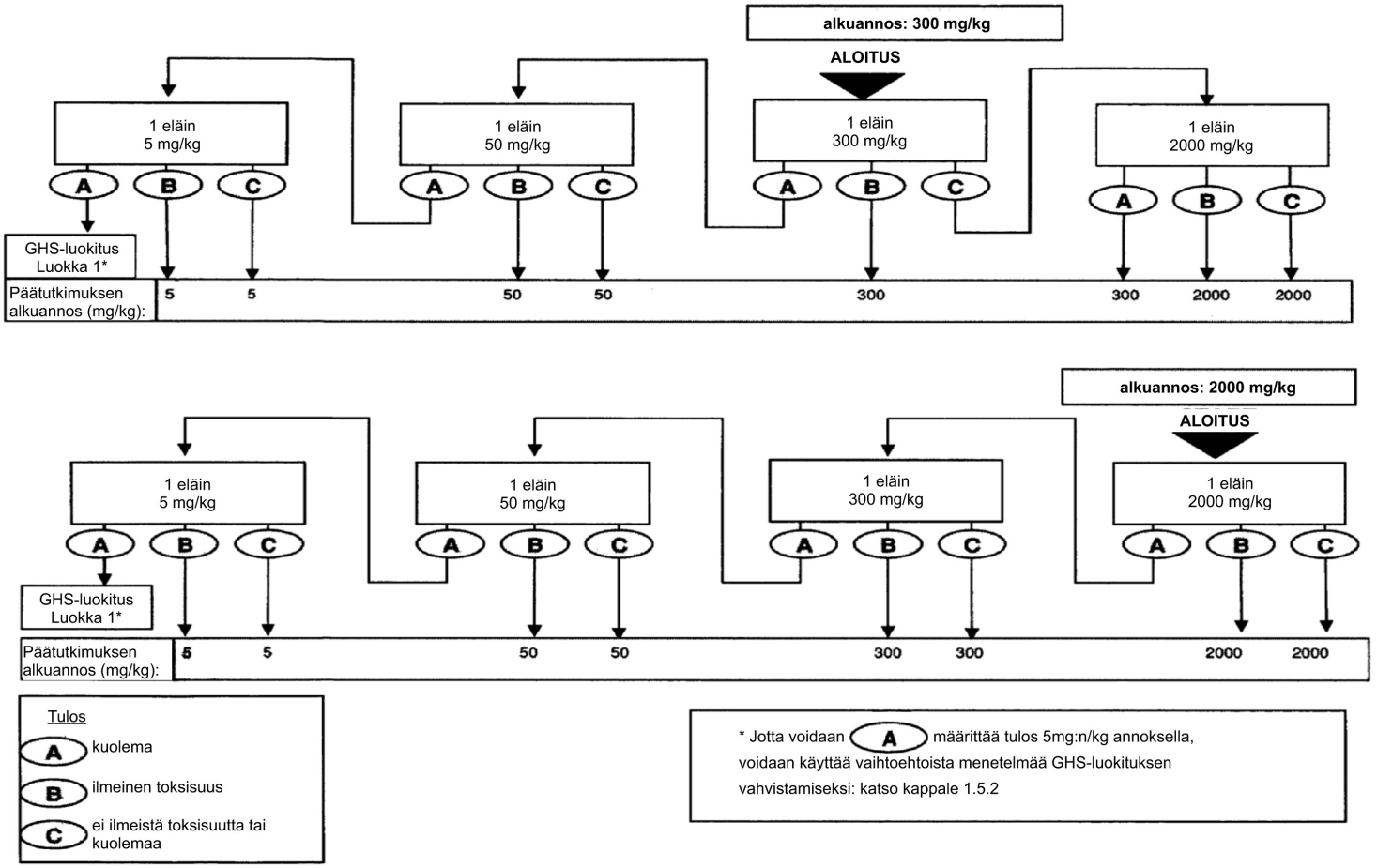
(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology . 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

LIITE 1:

ESIKOKEEN TOIMENPIDEKAAVIO

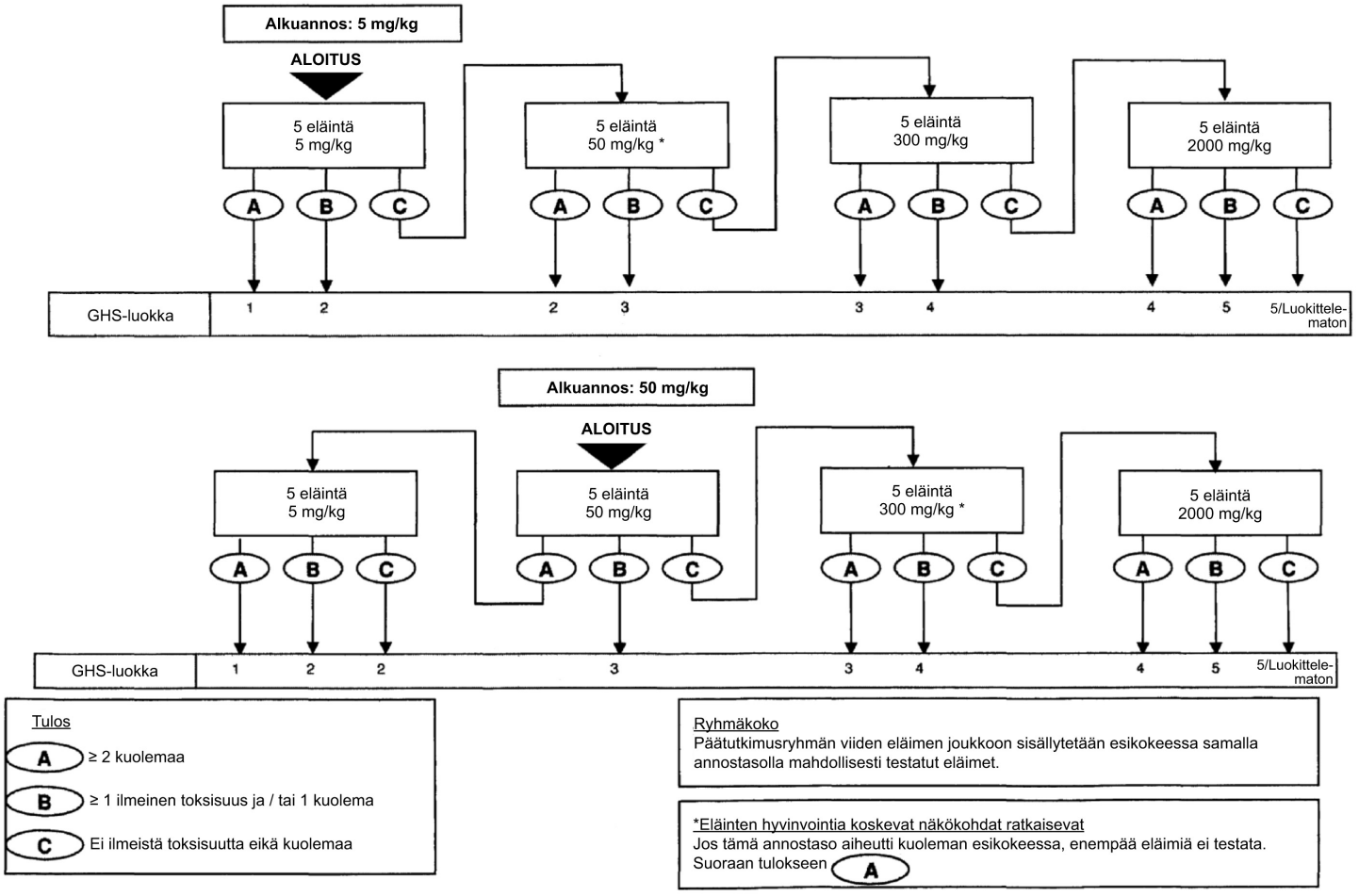


▼B

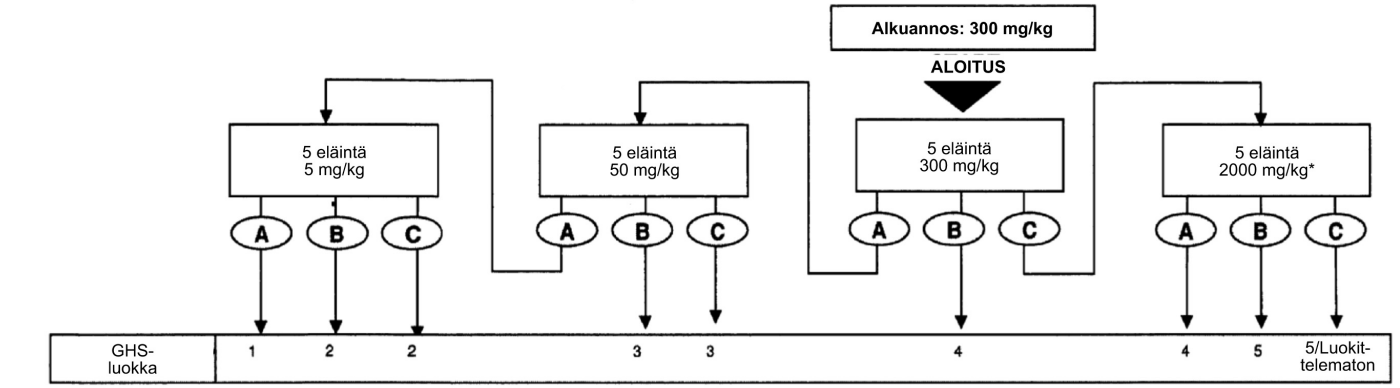

alkuannos: 300 mg/kg
ALOITUS
1 eläin
5 mg/kg
1 eläin
50 mg/kg
1 eläin
300 mg/kg
1 eläin
2000 mg/kg
A
B
C
GHS-luokitus
Luokka 1*
Päätutkimuksen
alkuannos (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
alkuannos: 2000 mg/kg
ALOITUS
1 eläin
5 mg/kg
1 eläin
50 mg/kg
1 eläin
300 mg/kg
1 eläin
2000 mg/kg
GHS-luokitus
Luokka 1*
Päätutkimuksen
alkuannos (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Tulos
A kuolema
B ilmeinen toksisuus
C ei ilmeistä toksisuutta tai kuolemaa
* Jotta voidaan A määrittää tulos 5mg:n/kg annoksella, voidaan käyttää vaihtoehtoista menetelmää GHS-luokituksen vahvistamiseksi: katso kappale 1.5.2

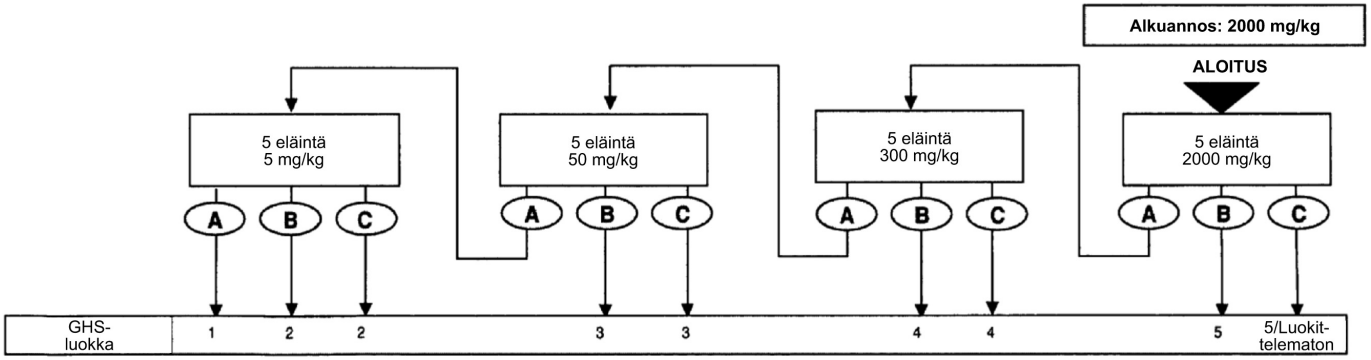
LIITE 2:

PÄÄTUTKIMUKSEN TOIMENPIDEKAAVIO



▼B





Tulos

A > 2 kuolemaa

B > 1 ilmeinen toksisuus ja / tai 1 kuolema

C Ei ilmeistä toksisuutta eikä kuolemaa

Ryhmäkoko

Päätutkimusryhmän viiden eläimen joukkoon sisällytetään esikokeessa samalla annostasolla mahdollisesti testatut eläimet.

*Eläinten hyvinvointia koskevat näkökohdat ratkaisevat

Jos tämä annostaso aiheutti kuoleman esikokeessa, enempää eläimiä ei testata.

Suoraan tulokseen A.

▼B

LIITE 3

PERUSTEET SELLAISTEN TESTIAINEIDEN LUOKITTELULLE, JOIDEN ODOTETTAVISSA OLEVA LD_{50}-ARVO YLITTÄÄ 2 000 MG/KG JA JOITA EI TARVITSE TESTATA

Vaarallisuusluokkaa 5 koskevien kriteereiden avulla on tarkoitus tunnistaa sellaiset testiaineet, joiden akuutti toksisuusvaara on suhteellisen alhainen, mutta jotka tietyissä olosuhteissa voivat olla vaaraksi heikommille populaatioille. Näiden aineiden LD_{50}-arvon odotetaan vaihtelevan välillä 2 000–5 000 mg/kg ihon tai suun kautta annosteltuna tai vastaavina annoksina muuta kautta annettuna. Testiaineet voidaan luokitella vaarallisuusluokkaan, jonka rajat ovat 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (luokka 5 GHS-järjestelmässä) seuraavissa tapauksissa:

a) mikäli aine määritellään missä tahansa liitteessä 2 esitetyistä koejärjestelyistä tähän luokkaan kuuluvaksi kuolleisuuden esiintymisen perusteella;

b) mikäli on jo käytettävissä luotettavia todisteita, joiden mukaan LD_{50} on luokkaan 5 kuuluvien arvojen vaihteluvälin rajoissa tai mikäli muut eläinkokeet tai toksiset vaikutukset ihmisillä osoittavat, että asialla on välitöntä merkitystä ihmisten terveydelle;

c) tietoja ekstrapoloimalla, arvioimalla tai mittaamalla, jos määritteleminen korkeampaan vaarallisuusluokkaan ei ole aiheellista; ja kun

   — käytettävissä on luotettavaa tietoa, joka osoittaa huomattavia toksisuusvaikutuksia ihmisillä, tai

   — kun havaitaan kuolleisuutta testattaessa suun kautta enintään luokkaa 4 vastaavia arvoja, tai kun

   — asiantuntija-arvio vahvistaa huomattavia kliinisiä toksisuusoireita testattaessa enintään luokkaa 4 vastaavia arvoja, lukuun ottamatta ripulia, piloerektiota tai puhtauden laiminlyöntiä, tai kun

   — asiantuntija-arvio vahvistaa muista eläinkokeista saadut luotettavat tiedot, joiden mukaan huomattavat akuutit vaikutukset ovat mahdollisia.

TESTAAMINEN 2 000 MG/KG YLITTÄVILLÄ ANNOKSILLA

Korkeinta 5 000 mg:n/kg vakioannostasoa voidaan käyttää poikkeuksellisesti ja vain silloin, kun se on perusteltua erityisten sääntelyyn liittyvien vaatimusten vuoksi. Koska eläinten hyvinvointia on suojeltava, kokeiden tekeminen 5 000 mg:n/kg annoksella ei ole suositeltavaa, ja sitä tulee käyttää vain kun on erittäin todennäköistä, että tällaisen kokeen tuloksilla on välitöntä merkitystä eläinten tai ihmisten terveyden tai ympäristön suojelemiselle (9).

Esikoe

Liitteessä 1 esitettyä vaiheittaista menettelyä koskevia päätöksentekosääntöjä laajennetaan siten, että niihin sisältyy 5 000 mg:n/kg annostaso. Käytettäessä esikokeen alkuannoksena 5 000 mg:aa/kg tulos A (kuolema) edellyttää kokeen tekemistä toisella eläimellä 2 000 mg:n/kg annoksella. Jos saadaan tulos B tai C (ilmeinen toksisuus tai ei toksisuutta), voidaan päätutkimuksen alkuannokseksi valita 5 000 mg/kg. Vastaavasti käytettäessä muuta alkuannosta kuin 5 000 mg:aa/kg koetta jatketaan 5 000 mg:aan/kg asti siinä tapauksessa, että kokeen tulos on B tai C 2 000 mg:n/kg annoksella. Mikäli 5 000 mg:n/kg annoksella saadaan myöhemmin tulokseksi A, on päätutkimuksen alkuannos 2 000 mg/kg. Mikäli tulokseksi saadaan B ja C, on päätutkimuksen alkuannos 5 000 mg/kg.

▼B

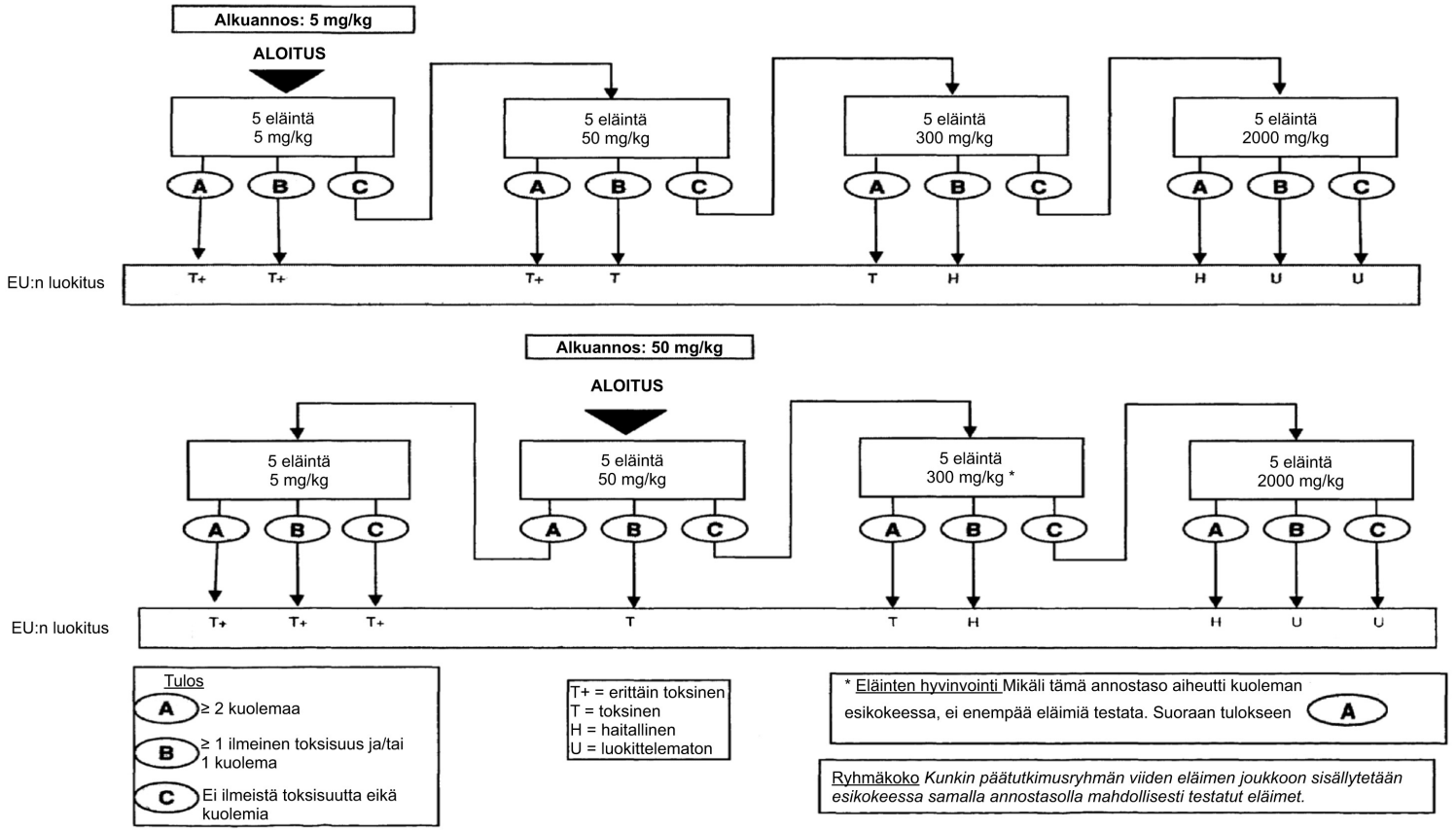
Päätutkimus

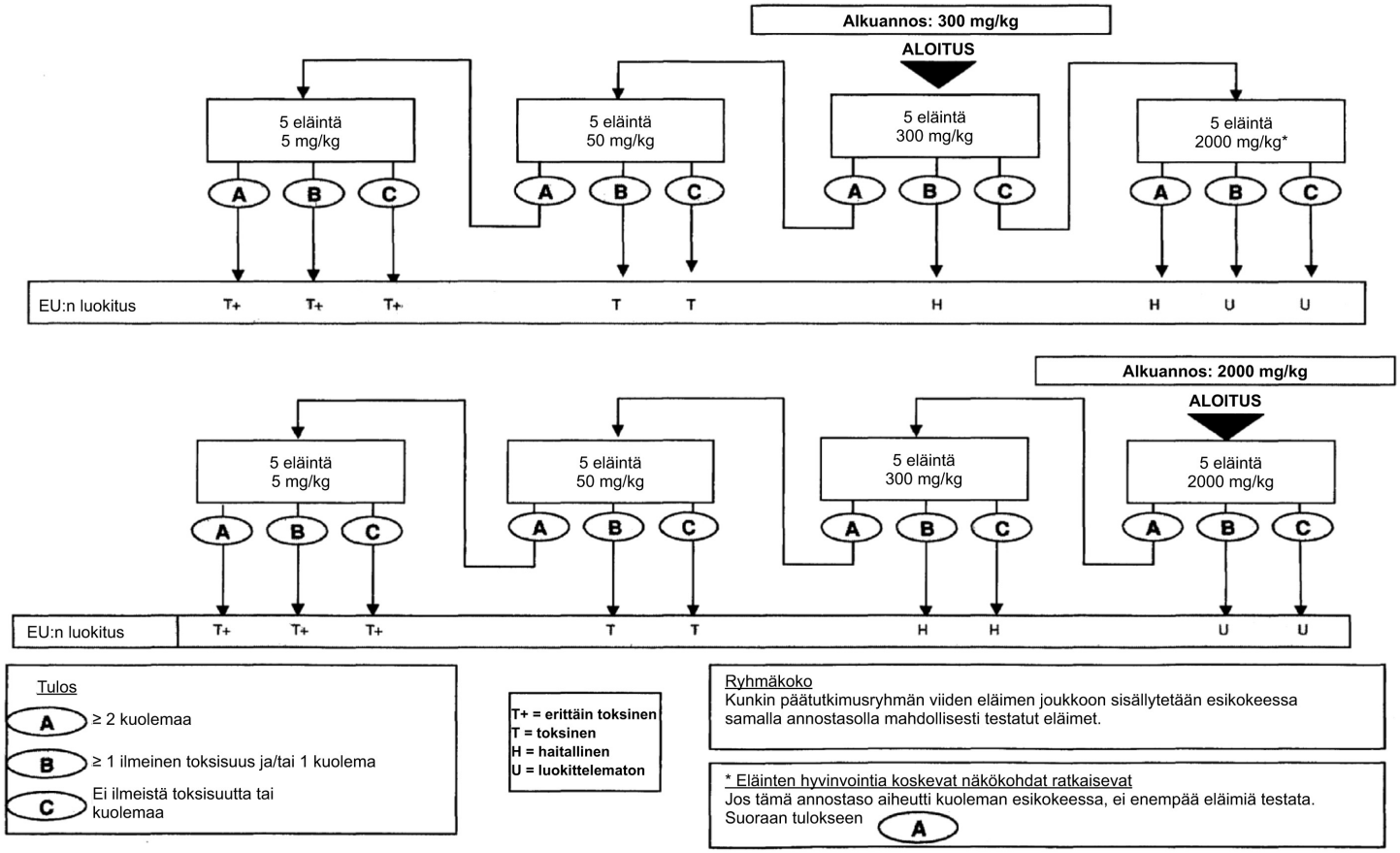
Liitteessä 2 esitettyä vaiheittaista menettelyä koskevia päätöksentekosääntöjä laajennetaan siten, että niihin sisältyy 5 000 mg:n/kg annostaso. Käytettäessä päätutkimuksen alkuannoksena 5 000 mg:aa/kg tulos A (>2 kuolemaa) edellyttää kokeen tekemistä toisella ryhmällä 2 000 mg:n/kg annoksella. Mikäli tulos on B (ilmeinen toksisuus ja/tai < 1 kuolemaa) tai C (ei toksisuutta), ainetta ei GHS-järjestelmän mukaan luokitella. Vastaavasti käytettäessä muuta alkuannosta kuin 5 000 mg:aa/kg koetta jatketaan 5 000 mg:aan/kg asti siinä tapauksessa että kokeen tulos on C 2 000 mg:n/kg annoksella. Mikäli myöhemmin saadaan 5 000 mg:n/kg annoksella tulos A, aine luokitellaan kuuluvaksi GHS-järjestelmän luokkaan 5. Mikäli tulos on B tai C, ainetta ei luokitella.

LIITE 4

KOEMENETELMÄ B. 1 a

EU:n järjestelmän mukaiset luokitteluohjeet, joita käytetään siirtymäkaudella ennen kansainvälisesti yhdenmukaistetun järjestelmän (GHS) (viitteessä (8)) täysimääräistä täytäntöönpanoa




Alkuannos: 300 mg/kg
ALOITUS
5 eläintä 5 mg/kg
5 eläintä 50 mg/kg
5 eläintä 300 mg/kg
5 eläintä 2000 mg/kg*
A B C
EU:n luokitus
T+ T+ T+ T T H H U U
Alkuannos: 2000 mg/kg
ALOITUS
5 eläintä 5 mg/kg
5 eläintä 50 mg/kg
5 eläintä 300 mg/kg
5 eläintä 2000 mg/kg
EU:n luokitus
T+ T+ T+ T T H H U U
Tulos
A ≥ 2 kuolemaa
B ≥ 1 ilmeinen toksisuus ja/tai 1 kuolema
C Ei ilmeistä toksisuutta tai kuolemaa
T+ = erittäin toksinen
T = toksinen
H = haitallinen
U = luokittelematon
Ryhmäkoko
Kunkin päätutkimusryhmän viiden eläimen joukkoon sisällytetään esikokeessa samalla annostasolla mahdollisesti testatut eläimet.
* Eläinten hyvinvointia koskevat näkökohdat ratkaisevat
Jos tämä annostaso aiheutti kuoleman esikokeessa, ei enempää eläimiä testata.
Suoraan tulokseen A

▼B

B.1 b. **AKUUTTI ORAALINEN TOKSISUUS — AKUUTIN TOKSISUUSLUOKAN MENETELMÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro TG 423 (2001)

1.1 JOHDANTO

Tässä esitetään vaiheittainen akuutin toksisuusluokan menetelmä (1), jonka kussakin vaiheessa käytetään kolmea samaa sukupuolta olevaa eläintä. Testiaineen akuutin toksisuuden arvioimiseksi saatetaan tarvita keskimäärin kahdesta neljään vaihetta riippuen eläinten kuolleisuudesta ja/tai siitä, ovatko ne kuolemaisillaan. Menetelmä on toistettava ja siinä käytetään erittäin vähän eläimiä. Sillä voidaan luokitella aineita vaarallisuuden mukaan samalla tavoin kuin muilla akuutin toksisuuden tutkimusmenetelmillä. Akuutin toksisuusluokan menetelmä perustuu biometrisiin arviointeihin (2) (3) (4) (5) vakioannoksilla, jotka eroavat toisistaan riittävästi aineen luokittelemiseksi vaarallisuuden mukaan ja riskin arvioimiseksi. Menetelmä hyväksyttiin vuonna 1996, ja se on validoitu laajasti sekä kansallisella tasolla (6) että kansainvälisellä tasolla (7) *in vivo* vertaamalla tuloksia kirjallisuudesta saatuihin LD_{50}-arvoja koskeviin tietoihin.

Ohjeita tiettyyn tarkoitukseen sopivimman tutkimusmenetelmän valinnasta on annettu akuutin oraalisen toksisuuden testausta käsittelevässä ohjeasiakirjassa (Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (S)). Ohjeasiakirjassa on myös lisätietoa tutkimusmenetelmä B.1 b:n käyttämisestä ja tulkinnasta.

Testiaineita ei tarvitse annostella annoksina, joiden tiedetään aiheuttavan voimakasta kipua ja kärsimystä syövyttävien tai vaikea-asteisten ärsytysvaikutusten vuoksi. Kuolemaisillaan olevat, selvästi kärsivät tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla, ja koetulosten tulkinnassa ne on otettava huomioon samalla tavalla kuin kokeessa kuolleet eläimet. Erillisessä ohjeasiakirjassa (9) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

Menetelmässä käytetään etukäteen määriteltyjä annoksia, ja tulosten avulla voidaan määritellä aineen vaarallisuusaste ja luokitella se akuuttia toksisuutta aiheuttavien kemikaalien kansainvälisesti yhdenmukaistetun luokitusjärjestelmän mukaisesti (Globally Harmonised System for the classification of chemicals which cause acute toxicity (10)).

Periaatteessa menetelmän avulla ei ole tarkoitus laskea tarkkaa LD_{50}-annosta, vaan sillä voidaan määrittää tietty altistusalue, jolla kuolleisuutta on odotettavissa, sillä kokeen tärkein päätepiste on edelleenkin se, että osa eläimistä kuolee. Menetelmän avulla voidaan määrittää LD_{50}-arvo vain silloin, kun vähintään kaksi annosta aiheuttaa kuolleisuuden, joka on korkeampi kuin 0 % ja alhaisempi kuin 100 %. Menetelmässä käytetään testiaineesta riippumatta tiettyjä etukäteen määriteltyjä annoksia, ja luokitus tehdään selkeästi eri tilassa olevien eläinten määrästä tehtyjen havaintojen perusteella. Tämän ansiosta eri laboratorioiden raportit ovat yhdenmukaisempia ja toistettavampia.

▼B

Koelaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen suorittamista. Näitä tietoja ovat mm. aineen tunnistetiedot ja kemiallinen rakenne, sen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kaikkien muiden aineella *in vitro* tai *in vivo* suoritettujen toksisuuskokeiden tulokset, rakenteellisesti samanlaisten aineiden toksikologiset tiedot ja aineen odotettu käyttö. Nämä tiedot ovat välttämättömiä kaikkien asianosaisten vakuuttamiseksi siitä, että kokeella on merkitystä ihmisten terveyden suojelun kannalta ja että sen avulla voidaan valita sopiva alkuannos.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Akuutti oraalinen toksisuus: haittavaikutukset, joita esiintyy, kun ainetta on annosteltu suun kautta kerta-annoksena tai useina annoksina 24 tunnin aikana.

Viivästynyt kuolema: eläin ei kuole tai vaikuta kuolevalta 48 tunnin kuluessa, mutta kuolee myöhemmin 14 päivän havainnointijakson aikana.

Annos: annostellun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esimerkiksi mg/kg).

GHS: Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (Kemiallisten aineiden ja seosten kansainvälisesti yhdenmukaistettu luokitusjärjestelmä). Yhteinen toimi, johon osallistuvat OECD (ihmisten terveys ja ympäristö), YK:n vaarallisten aineiden kuljettamista käsittelevä asiantuntijakomitea (fysikaalis-kemialliset ominaisuudet) ja ILO (vaarojen ilmoittaminen) ja jota koordinoi kemikaalien järkevää hallinnointia koskeva organisaatioiden välinen ohjelma (IOMC).

Uhkaava kuolema: eläin on vakavasti sairas tai kuolee todennäköisesti ennen seuraavaa suunniteltua havainnointiajankohtaa. Jyrsijöillä tällaista tilaa osoittavia merkkejä voivat olla kouristukset, kyljellään makaaminen, velttous ja vapina. (Katso tarkempia tietoja eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevasta ohjeasiakirjasta (9)).

LD_{50} (median lethal oral dose, keskimääräinen tappava annos suun kautta annettuna): on tilastollinen kerta-annos, jonka voidaan suun kautta annosteltuna odottaa tappavan puolet annoksen saaneista eläimistä. LD_{50}-arvo ilmoitetaan testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (mg/kg).

Raja-annos: kokeen yläraja-annos (2 000 tai 5 000 mg/kg).

Kuolemaisillaan oleva: eläin, joka on kuolemaisillaan tai ei kykene säilymään hengissä hoidosta huolimatta. (Katso tarkempia lisätietoja eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevasta ohjeasiakirjasta (9)).

Ennustettava kuolema: sellaisten kliinisten oireiden esiintyminen, jotka viittaavat siihen, että eläin tulee kuolemaan tietyn ajan kuluttua ennen kokeen suunniteltua päättymistä. Näitä oireita ovat esimerkiksi kykenemättömyys käyttää vettä tai ruokaa. (Katso tarkempia lisätietoja eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevasta ohjeasiakirjasta (9)).

▼B

1.3 TESTIN PERIAATE

Testin periaate on, että vaiheittaisella menetelmällä ja käyttämällä mahdollisimman vähän eläimiä kussakin vaiheessa saadaan riittävästi tietoa testiaineen akuutista toksisuudesta sen luokittelemiseksi. Ainetta annetaan koe-eläinryhmälle suun kautta yhdellä määritellyistä annostasoista. Ainetta testataan vaiheittain siten, että kussakin vaiheessa käytetään kolmea samaa sukupuolta olevaa eläintä (yleensä naaraita). Kyseisestä yhdisteestä johtuva kuolleisuus kussakin testin vaiheessa määrää kokeen seuraavan vaiheen, eli

— lisäkokeita ei tarvita,

— ainetta annetaan kolmelle muulle eläimelle samalla annostasolla,

— ainetta annetaan kolmelle muulle eläimelle astetta korkeammalla tai astetta matalammalla annostasolla.

Testin suoritus on kuvattu yksityiskohtaisesti liitteessä 1. Menetelmän avulla testiaine voidaan luokitella johonkin niistä toksisuusluokista, jotka on määritelty kiinteiden LD_{50}-raja-arvojen perusteella.

1.4 MENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Eläinlajin valinta**

Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, tosin muitakin jyrsijöitä voidaan käyttää. Yleensä käytetään naaraita (9). Syynä tähän on, että tavanomaisia LD_{50}-kokeita koskevien kirjallisuustutkimusten perusteella sukupuolten herkkyydessä on vähäisiä eroja, mutta silloin kun eroja on havaittu, naaraat ovat yleensä hieman herkempiä (11). Mikäli rakenteellisesti samanlaisten kemikaalien toksikologisia ja toksikokineettisiä ominaisuuksia koskevat tiedot osoittavat urosten olevan herkempiä, on käytettävä uroksia. Kokeen tekeminen uroksilla edellyttää riittäviä perusteita.

Kokeeseen on käytettävä terveitä, nuoria ja täysikasvuisia yleisesti käytettyjä koe-eläinkantoja. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä kantavia. Kunkin eläimen on annostuksensa alussa oltava 8–12 viikon ikäinen, ja sen paino saa poiketa korkeintaan ± 20 % aikaisemmin annoksen saaneiden eläinten keskipainosta.

1.4.2 **Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta**

Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittävät vaatimukset suhteellisen kosteuden suhteen ovat vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Eläimet voidaan sijoittaa eri häkkeihin ryhmissä annoksen mukaan, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia.

▼B

1.4.3 **Eläinten valmistelu**

Eläimet valitaan satunnaisesti ja merkitään yksilötunnistusta varten. Eläimiä pidetään häkeissään vähintään viiden päivän ajan ennen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-oloihin.

1.4.4 **Annosten valmistelu**

Yleensä testiaineen testattavat annokset annostellaan vakiotilavuudessa niin, että annosteltavan valmisteen pitoisuus vaihtelee. Testattaessa nestemäistä lopputuotetta tai seosta testiaineen käyttö laimentamattomana eli vakiopitoisena saattaa kuitenkin olla oleellista kyseisen aineen myöhemmän riskinarvioinnin kannalta, ja jotkut sääntelyviranomaiset edellyttävätkin tällaista menettelyä. Kummassakaan tapauksessa annoksen enimmäistilavuutta ei saa ylittää. Kerralla annettava nesteen enimmäismäärä riippuu koe-eläimen koosta. Jyrsijöillä määrä ei yleensä saa olla yli 1 ml sataa painogrammaa kohti. Vesiliuoksia voidaan kuitenkin antaa 2 ml sataa painogrammaa kohti. Annostellun valmisteen koostumukseksi suositellaan vesipohjaista liuosta/suspensiota/emulsiota aina kun se on mahdollista. Muussa tapauksessa on mieluiten käytettävä öljypohjaista (esimerkiksi maissiöljy) liuosta/suspensiota/emulsiota tässä järjestyksessä ja sen jälkeen muihin kantaja-aineisiin pohjautuvia liuoksia. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen toksiset ominaisuudet on tunnettava. Annokset on valmistettava vähän ennen annostelua paitsi, jos valmisteen tiedetään säilyttävän stabiliteettinsa käytön ajan ja sen on osoitettu olevan hyväksyttävä.

1.5 TESTIN SUORITUS

1.5.1 **Annostelu**

Testiaine annetaan kerta-annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Mikäli kerta-annostelu ei poikkeuksellisesti ole mahdollinen, annos voidaan antaa pienempinä osina enintään 24 tunnin kuluessa.

Eläimiä ei saa ruokkia ennen annostelua (esimerkiksi rottaa on pidettävä ruoatta yli yön ja hiirtä 3–4 tuntia, mutta vettä tulee olla tarjolla). Paaston jälkeen eläimet punnitaan ja niille annetaan testiaine. Aineen annostelun jälkeen ruokintaa voidaan siirtää rotilla vielä 3–4 tuntia ja hiirillä 1–2 tuntia. Mikäli annos annetaan osina tietyn ajan kuluessa, eläimille saatetaan joutua antamaan ruokaa ja vettä jakson pituudesta riippuen.

1.5.2 **Eläinten määrä ja annostasot**

Kussakin vaiheessa käytetään kolmea eläintä. Alkuannostasoksi valitaan yksi neljästä vakiotasosta, jotka ovat 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kg. Alkuannostason tulee olla sellainen, että se todennäköisesti tappaa muutaman annoksen saaneista eläimistä. Liitteessä 1 esitetyissä toimenpidekaavioissa kuvataan kunkin alkuannoksen yhteydessä noudatettava menettely. Lisäksi liitteessä 4 annetaan ohjeita EU:n järjestelmän mukaisesta luokituksesta ennen uuden GHS-järjestelmän käyttöönottoa.

▼B

Kun saatavissa olevat tiedot viittaavat siihen, ettei korkein alkuannostaso (2 000 mg/kg) todennäköisesti aiheuta eläinten kuolemaa, on tehtävä raja-annostesti. Kun testiaineesta ei ole tietoja, alkuannokseksi suositellaan eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi 300 mg/kg.

Testiryhmien testaamisen aikavälit määritellään toksisten oireiden alkamishetken, keston ja vaikeusasteen mukaan. Seuraavan annoksen antamista tulee siirtää, kunnes jo annosteltujen eläinten eloonjäämisestä on saatu varmuus.

Korkeinta 5 000 mg:n/kg annostasoa voidaan käyttää poikkeuksellisesti ja vain silloin, kun se on perusteltua erityisten sääntelyyn liittyvien vaatimusten vuoksi (katso liite 2). Eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi eläinkokeiden tekeminen GHS-luokan 5 annoksilla (2 000–5 000 mg/kg) ei ole suositeltavaa, ja niitä tulee käyttää vain, kun on erittäin todennäköistä, että tällaisen kokeen tuloksilla on välitöntä merkitystä ihmisten tai eläinten terveyden tai ympäristön suojelemiselle.

1.5.3 **Raja-annostesti**

Raja-annostestiä käytetään pääasiassa silloin, kun tutkimuksen tekijällä on tietoa, jonka mukaan testiaine on todennäköisesti ei-toksinen, toisin sanoen se on toksista ainoastaan ylittäessään säädösten mukaiset raja-annokset. Tietoa testiaineen toksisuudesta saadaan samanlaisia testattuja yhdisteitä tai seoksia koskevista tiedoista, kun otetaan huomioon, mitä toksikologisesti merkittävät ainesosat ovat ja mikä on niiden prosenttiosuus. Päätutkimus on suoritettava, kun testiaineen toksisuudesta on vain vähän tai ei lainkaan tietoa tai kun se todennäköisesti on toksinen.

Raja-annostesti voidaan tehdä yhdellä annostasolla 2 000 mg/kg käyttäen kuutta eläintä (kolme eläintä vaihetta kohden). Poikkeuksellisesti voidaan tehdä raja-annostesti yhdellä annostasolla 5 000 mg/kg käyttäen kolmea eläintä (katso liite 2). Mikäli testiaineeseen liittyvää kuolleisuutta esiintyy, voidaan tarvita lisäkokeita seuraavaksi alemmalla annostasolla.

1.6 HAVAINNOINTI

Eläimiä havainnoidaan yksittäin annostelun jälkeen vähintään yhden kerran ensimmäisten 30 minuutin aikana ja säännöllisin väliajoin ensimmäisten 24 tunnin aikana. Havainnoinnin on oltava erityisen tarkkaa ensimmäisten neljän tunnin aikana. Sen jälkeen havainnointi tapahtuu päivittäin 14 päivän ajan paitsi, jos eläin on poistettava tutkimuksesta ja lopetettava humaanilla tavalla eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi tai se löydetään kuolleena. Havainnoinnin kestoa ei pitäisi kuitenkaan määritellä tiukasti. Se tulee määrittää toksisten reaktioiden, niiden alkamishetken ja toipumisen keston perusteella ja sitä tulisi voida pidentää tarvittaessa. Toksisuusoireiden ilmaantumis- ja häviämisajankohdat ovat tärkeitä etenkin, jos toksisilla oireilla on taipumus viivästyä (12). Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti eläinkohtaisesti.

▼B

Lisähavainnointi on tarpeen jos eläinten toksisuusoireet jatkuvat. Havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, autonomisen hermoston ja keskushermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljeneritykseen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa ohjeasiakirjassa (9) esitetyt periaatteet ja perustelut on otettava huomioon. Kuolevat eläimet ja eläimet, jotka osoittavat merkkejä voimakkaasta kivusta ja jatkuvasta kovasta kärsimyksestä, tulee lopettaa humaanilla tavalla. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata mahdollisimman tarkasti.

1.6.1 **Ruumiinpaino**

Kunkin eläimen paino on määritettävä hieman ennen testiaineen annostelua ja vähintään viikoittain sen jälkeen. Painon muutokset on laskettava ja kirjattava. Kokeen päätyttyä henkiin jääneet eläimet punnitaan ja lopetetaan humaanilla tavalla.

1.6.2 **Patologia**

Kaikki koe-eläimet (myös kokeen aikana kuolleet tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi tutkimuksesta poistetut) on avattava. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata. Vähintään 24 tuntia hengissä säilyneiden eläinten makroskooppisia muutoksia sisältävät elimet voidaan myös tutkia mikroskooppisesti siitä mahdollisesti saatavan hyödyllisen tiedon vuoksi.

2. **TULOKSET**

Tuloksina on esitettävä yksittäisiä eläimiä koskevat tulokset. Kaikki tulokset tulee esittää myös yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin koeryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, toksisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 **Loppuraportti**

Loppuraportin tulee tarpeen mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (myös isomeroituminen),

— tunnistetiedot, CAS-numero mukaan lukien.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— perustelut kantaja-aineen valinnalle, mikäli se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji ja -kanta,

▼B

— eläinten mikrobiologinen status, mikäli se on tiedossa,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli (tarvittaessa myös perusteet urosten käytölle naaraiden sijasta),

— lähde, ylläpito-olosuhteet, ravinto jne.

Koeolosuhteet:

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta, mukaan luettuna annostellun aineen fysikaalinen muoto,

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen annostelusta, mukaan luettuina annostelutilavuudet ja -ajankohta,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan lukien eläinrehun tyyppi/lähde, veden lähde),

— alkuannoksen valintaperusteet.

Tulokset:

— kunkin eläimen vastetulosten ja annostason taulukot (toksisuusoireet, mukaan lukien kuolleisuus, vaikutusten luonne, vaikeusaste ja kesto),

— ruumiinpainon ja siinä tapahtuneiden muutosten taulukot,

— kunkin eläimen paino annostelupäivänä, sen jälkeen viikon välein sekä kuolin- tai lopettamishetkellä,

— kuolinpäivä ja -ajankohta, mikäli eläin kuolee ennen suunniteltua lopettamista,

— kunkin eläimen toksisuusoireiden alkamisajankohta ja niiden mahdollinen palautuminen,

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla.

Tulosten tarkastelu ja tulkinta.

Johtopäätökset.

4. **VIITTEET**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. and Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336–341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute- Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559–610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729–734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129–134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method — An Altemative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455–470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute- Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659–670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R. L, Cotruvo, J. A., Hill R. N., Bruce R. D., Stitzel K. A., Walker A. P., Chu I.; Goddard M., Segal L., Springer J. A. and Myers R. C. (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223–231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology.* Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

LIITE 1

TESTIN SUORITUS ERI ALKUANNOKSILLA

YLEISIÄ HUOMAUTUKSIA

Tässä liitteessä selostetaan testin suoritus kullekin alkuannokselle.

— Liite 1 a: alkuannos 5 mg/kg

— Liite 1 b: alkuannos 50 mg/kg

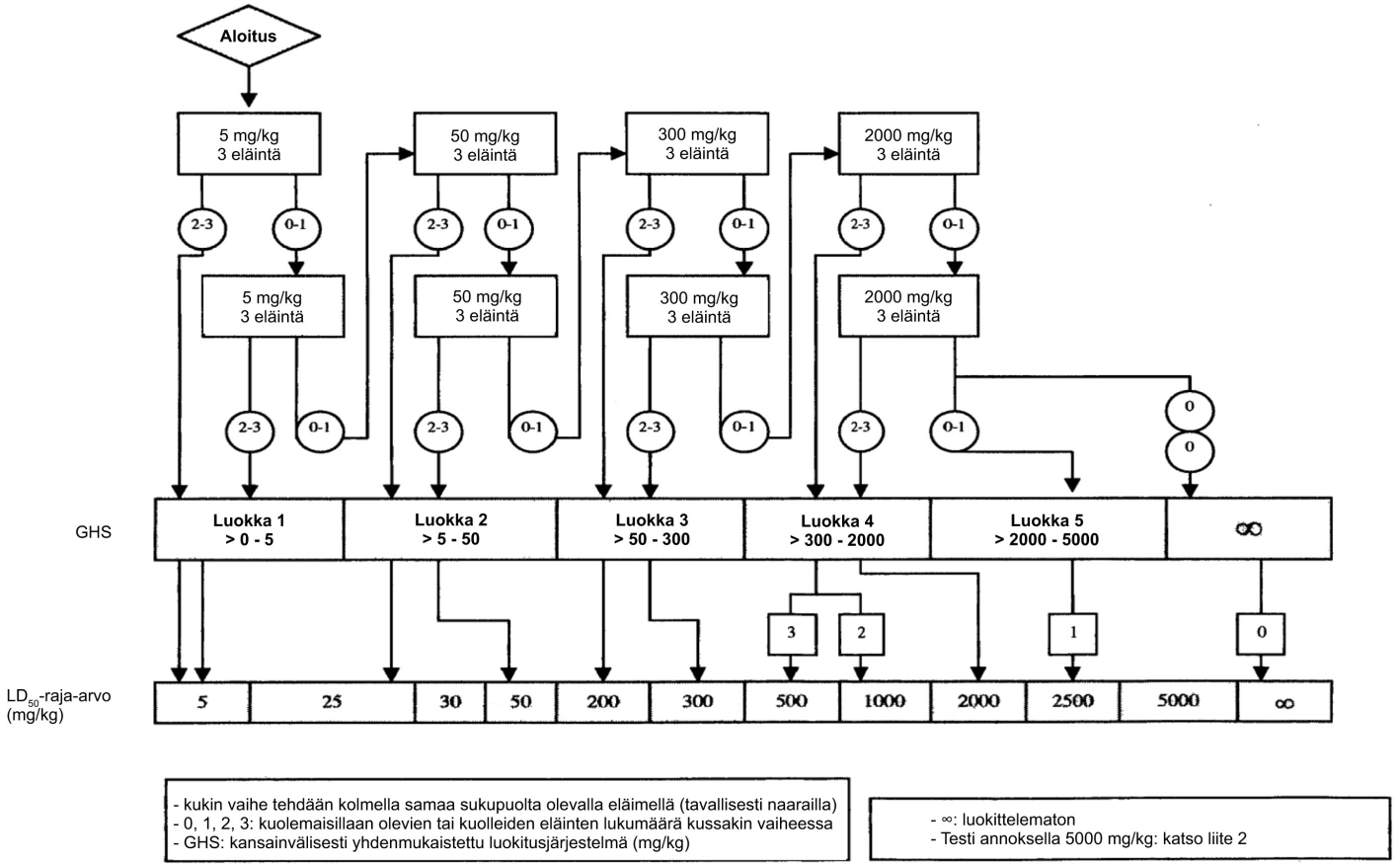
— Liite 1 c: alkuannos 300 mg/kg

— Liite 1 d: alkuannos 2 000 mg/kg

Humaanilla tavalla lopetettujen tai kuolleiden eläinten lukumäärästä riippuen koe etenee nuolten osoittamalla tavalla.

Liite 1 A

TESTIN SUORITUS ALKUANNOKSELLA 5 MG/KG

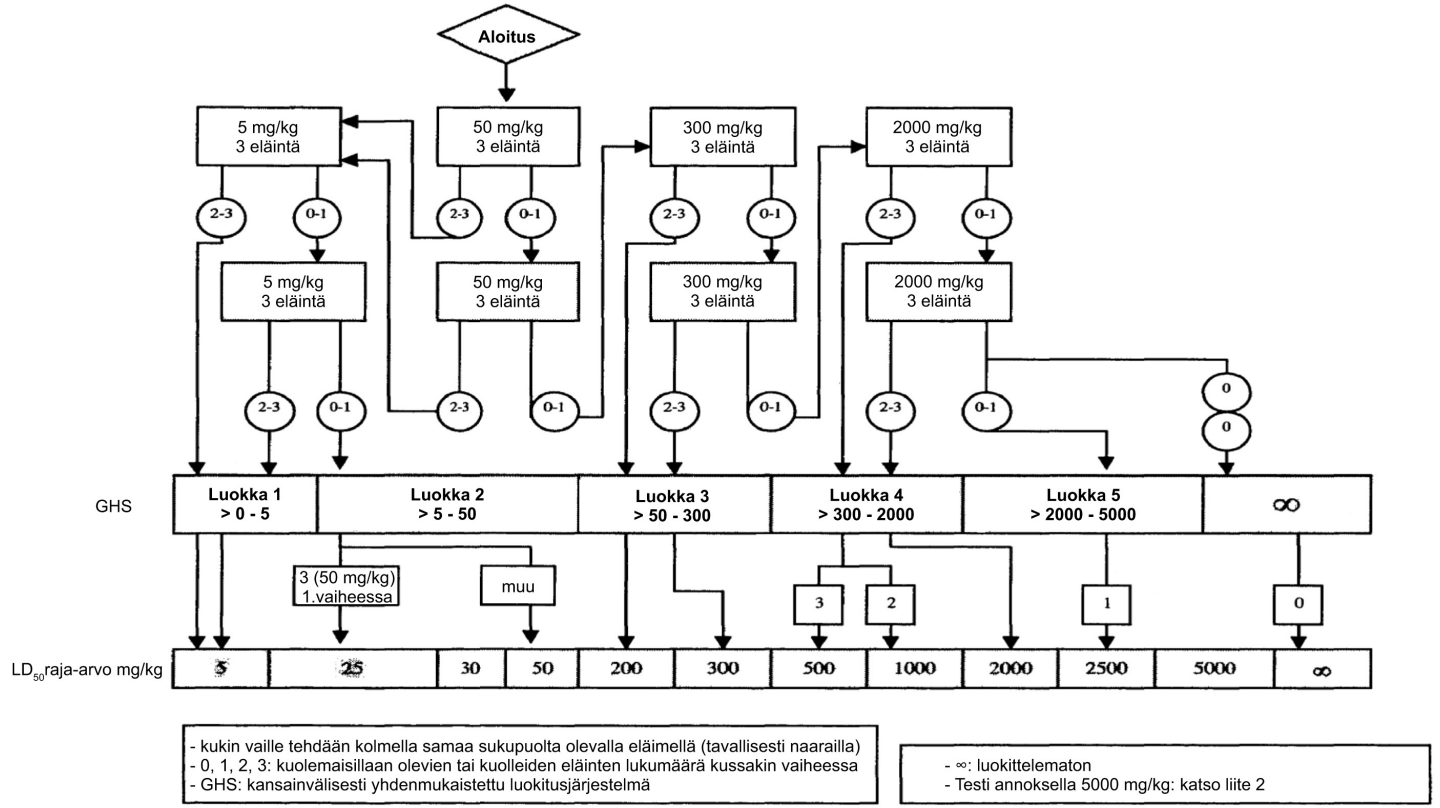


- kukin vaihe tehdään kolmella samaa sukupuolta olevalla eläimellä (tavallisesti naarailla)
- 0, 1, 2, 3: kuolemaisillaan olevien tai kuolleiden eläinten lukumäärä kussakin vaiheessa
- GHS: kansainvälisesti yhdenmukaistettu luokitusjärjestelmä (mg/kg)

- ∞: luokittelematon
- Testi annoksella 5000 mg/kg: katso liite 2

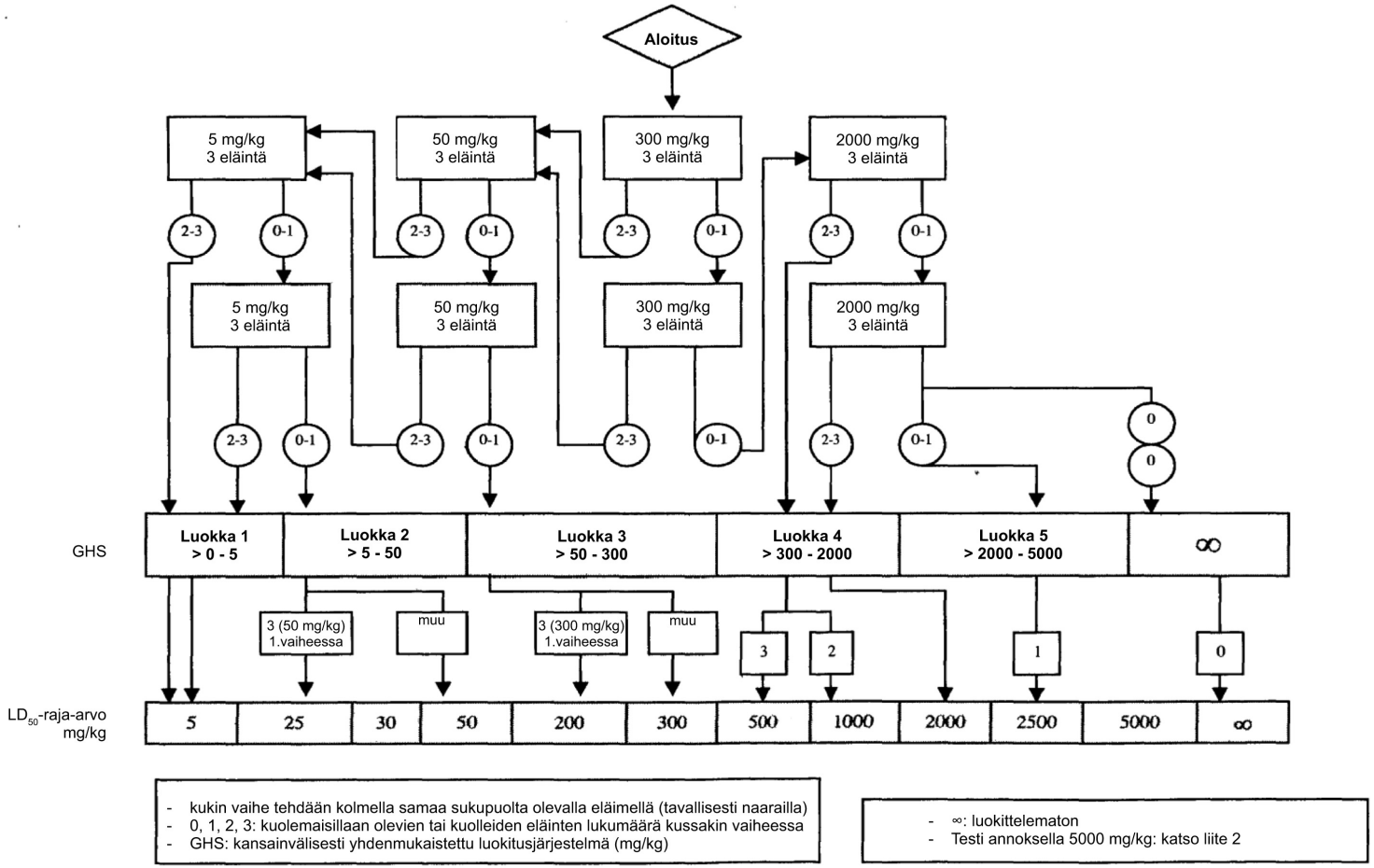
Liite 1 B

TESTIN SUORITUS ALKUANNOKSELLA 50 MG/KG



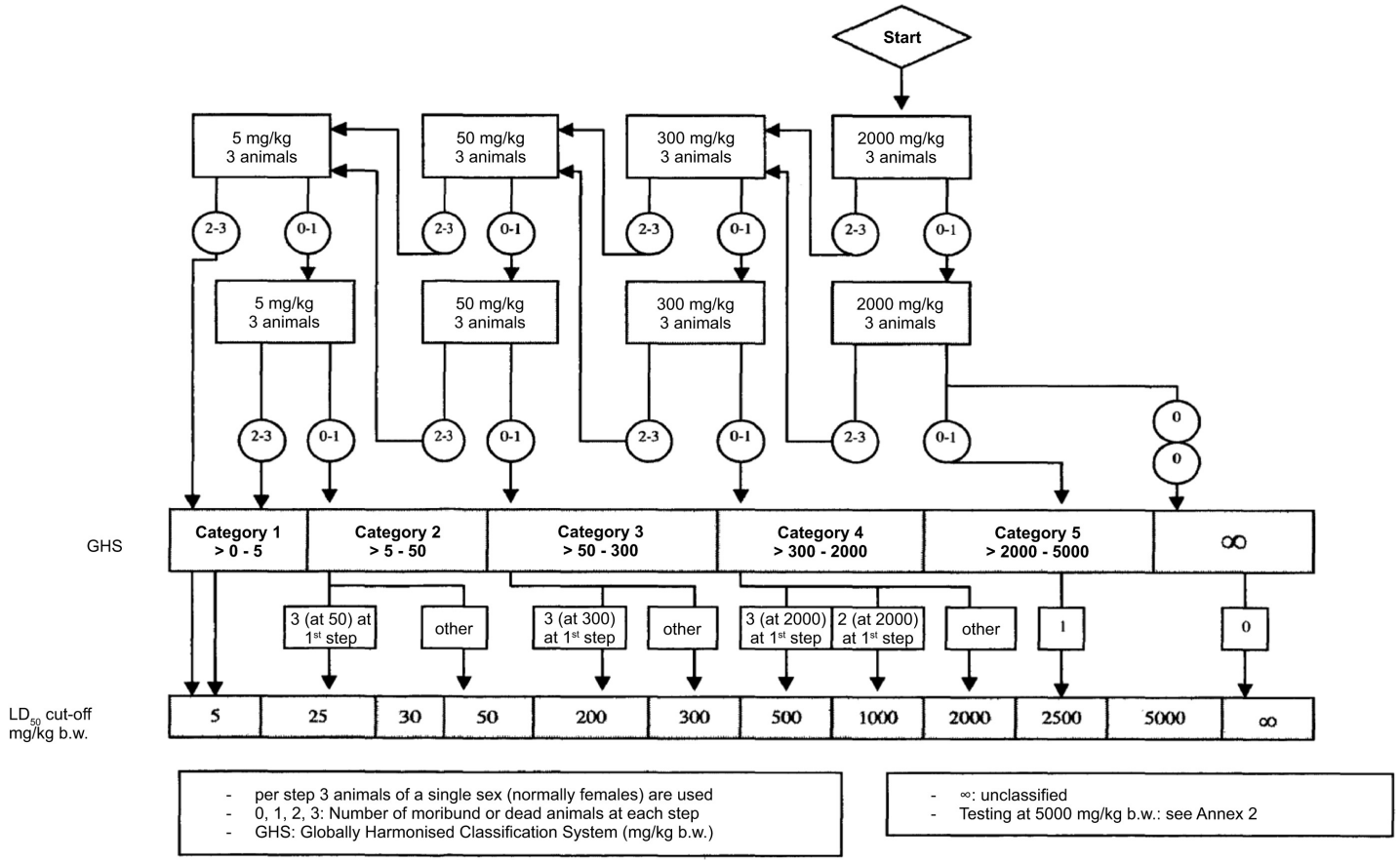
Liite 1 C

TESTIN SUORITUS ALKUANNOKSELLA 300 MG/KG



Liite 1 D

TESTIN SUORITUS ALKUANNOKSELLA 2 000 MG/KG



▼B

LIITE 2

PERUSTEET SELLAISTEN TESTIAINEIDEN LUOKITTELULLE, JOIDEN ODOTETTAVISSA OLEVA LD_{50}-ARVO YLITTÄÄ 2 000 MG/KG JA JOITA EI TARVITSE TESTATA

Vaarallisuusluokkaa 5 koskevien kriteereiden avulla on tarkoitus tunnistaa sellaiset testiaineet, joiden akuutti toksisuusvaara on suhteellisen alhainen, mutta jotka tietyissä olosuhteissa voivat olla vaaraksi herkimmille populaatioille. Näiden aineiden LD_{50}-arvon odotetaan vaihtelevan välillä 2 000–5 000 mg/kg ihon tai suun kautta annosteltuna tai vastaavina annoksina muuta kautta annettuna. Testiaineet on luokiteltava vaarallisuusluokkaan, jonka rajat ovat 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (luokka 5 GHS-järjestelmässä) seuraavissa tapauksissa:

a) mikäli aine määritellään missä tahansa liitteissä 1a-1d esitetyistä koejärjestelyistä tähän luokkaan kuuluvaksi kuolleisuuden esiintymisen perusteella;

b) mikäli on jo käytettävissä luotettavaa näyttöä, jonka mukaan LD_{50} on luokkaan 5 kuuluvien arvojen vaihteluvälin rajoissa tai mikäli muut eläinkokeet tai toksiset vaikutukset ihmisillä osoittavat, että aineella on välitöntä merkitystä ihmisten terveydelle;

c) tietoja ekstrapoloimalla, arvioimalla tai mittaamalla, jos määritteleminen korkeampaan vaarallisuusluokkaan ei ole aiheellista ja kun

   — käytettävissä on luotettavaa tietoa, joka osoittaa huomattavia toksisuusvaikutuksia ihmisillä, tai

   — kun havaitaan kuolleisuutta testattaessa suun kautta enintään luokkaa 4 vastaavia arvoja, tai kun

   — asiantuntija-arvio vahvistaa huomattavia kliinisiä toksisuusoireita testattaessa enintään luokkaa 4 vastaavia arvoja lukuun ottamatta ripulia, piloerektiota tai puhtauden laiminlyöntiä, tai kun

   — asiantuntija-arvio vahvistaa muista eläinkokeista saadut luotettavat tiedot, joiden mukaan huomattavat akuutit vaikutukset ovat mahdollisia.

TESTAAMINEN 2 000 MG/KG YLITTÄVILLÄ ANNOKSILLA

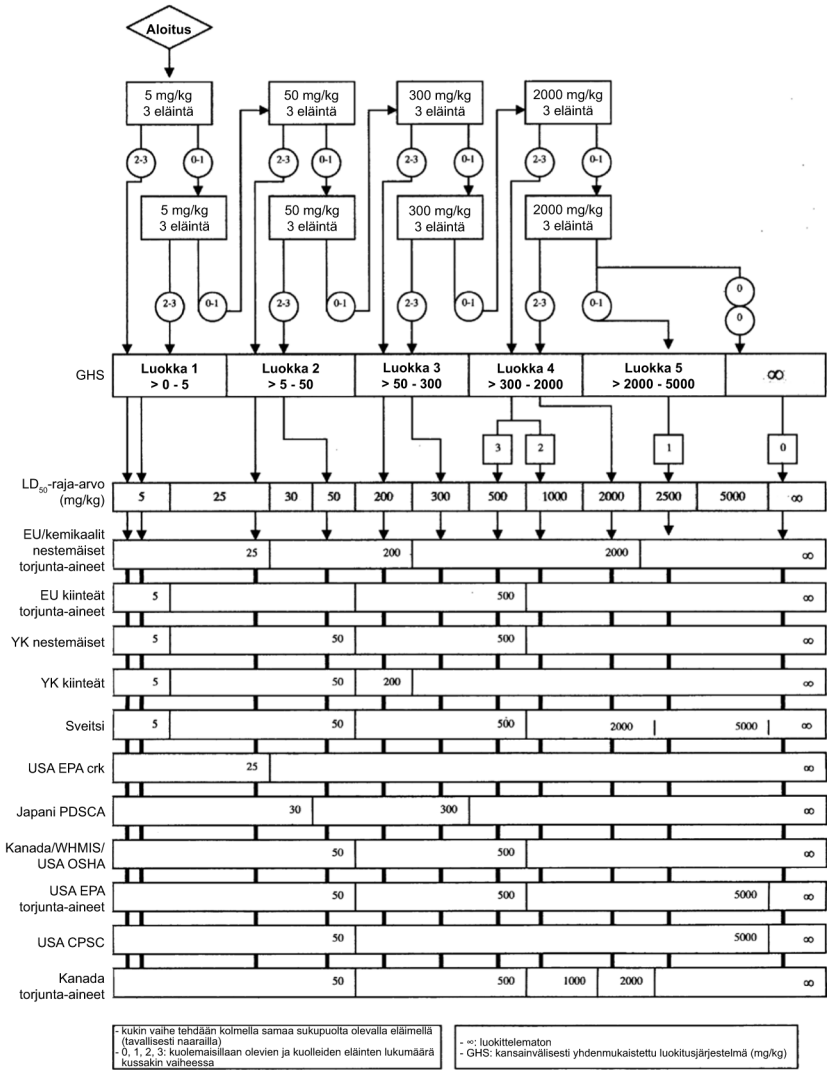
Koska eläinten hyvinvointia on suojeltava, testaaminen eläimillä luokan 5 (5 000 mg/kg) rajoissa ei ole suositeltavaa, ja sitä tulee käyttää vain kun on erittäin todennäköistä, että tällaisen kokeen tuloksilla on välitöntä merkitystä eläinten tai ihmisten terveyden suojelemiselle (10). Lisäkokeita korkeammilla annostasoilla ei pidä tehdä.

Kun kokeen tekeminen 5 000 mg:n/kg annoksella on välttämätöntä, tarvitaan vain yksi vaihe (eli kolme eläintä). Jos ensimmäinen annoksen saanut eläin kuolee, annostelua jatketaan 2 000 mg:n/kg annoksella liitteessä 1 esitettyjen toimenpidekaavioiden mukaisesti. Jos ensimmäinen eläin jää henkiin, kahdelle muulle eläimelle annetaan annos testiainetta. Jos vain yksi kolmesta eläimestä kuolee, LD_{50}-arvo ylittää todennäköisesti 5 000 mg/kg. Jos molemmat eläimet kuolevat, annostelua jatketaan 2 000 mg:lla/kg.

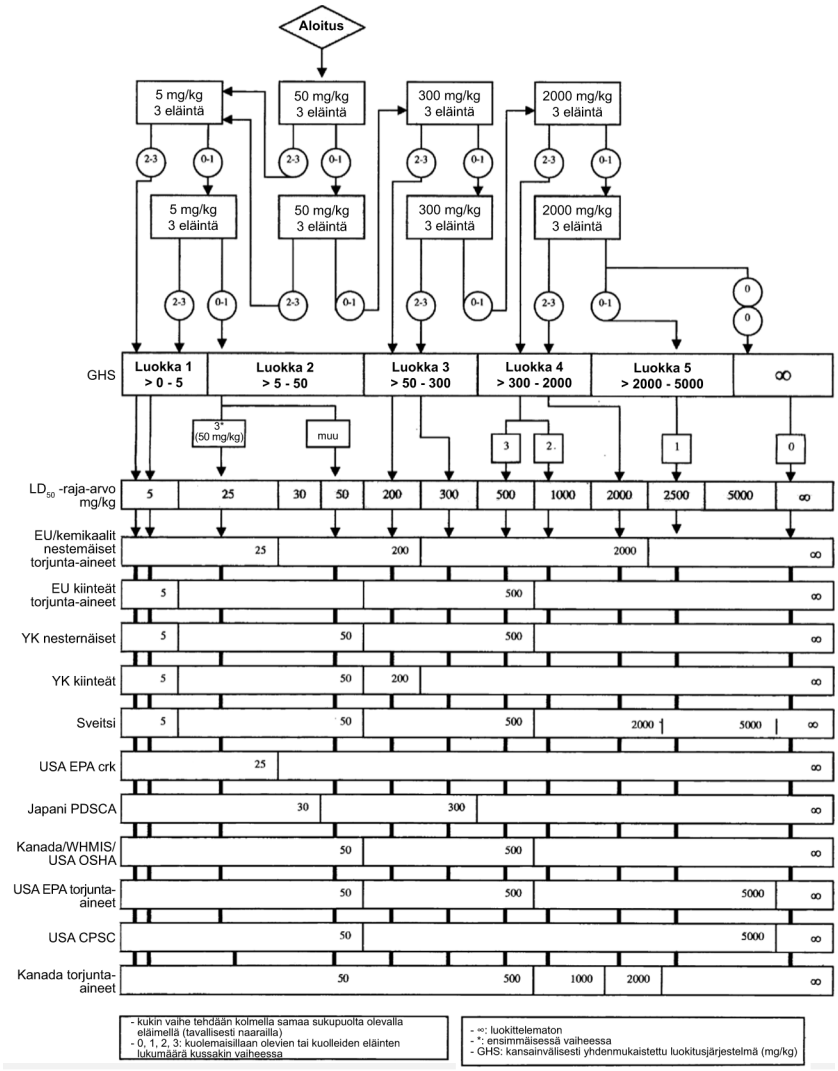
▼B

LIITE 3

KOEMENETELMÄ B.1 b: EU:n järjestelmän mukaiset luokitteluohjeet, joita käytetään siirtymäkaudella ennen kemikaalien kansainvälisesti yhdenmukaistetun järjestelmän (GHS) (viitteessä (8)) täysimääräistä täytäntöönpanoa



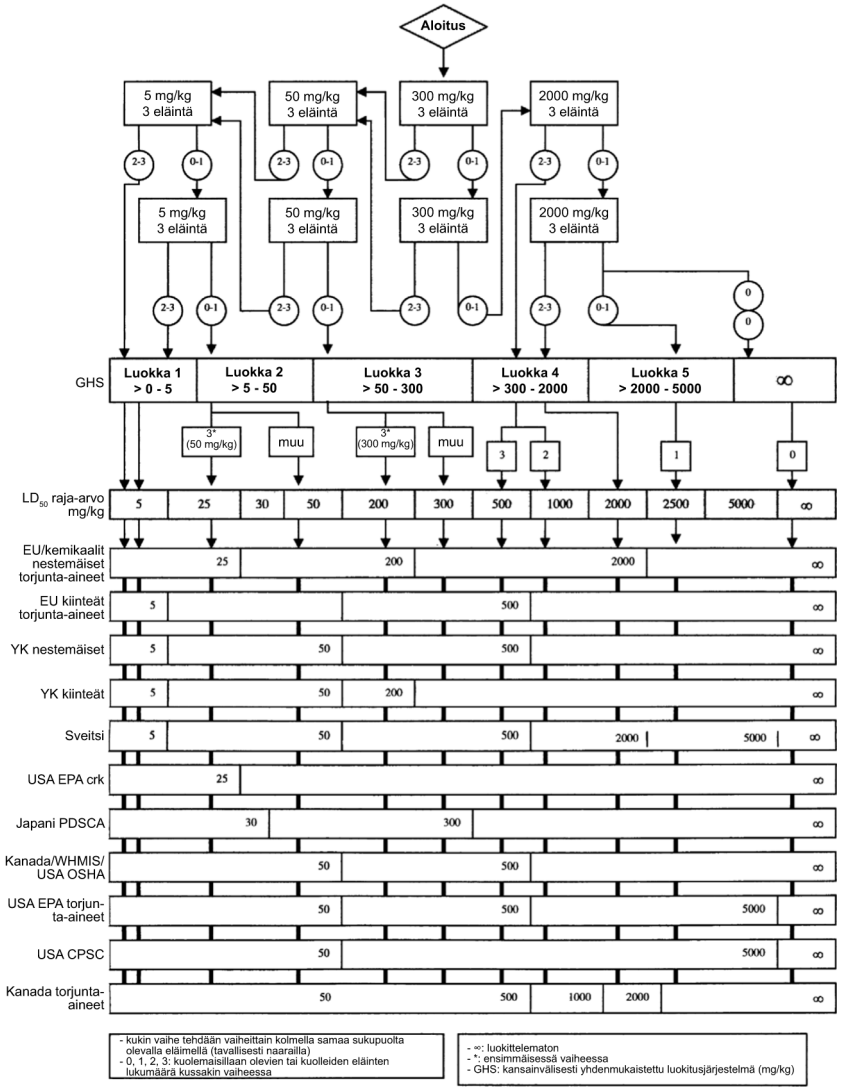
▼B



LIITE 3 (JATKOA 1)

KOEMENETELMÄ B.1 b: EU:n järjestelmän mukaiset luokitteluohjeet, joita käytetään siirtymäkaudella ennen kemikaalien kansainvälisesti yhdenmukaistetun järjestelmän (GHS) (viitteessä (8)) täysimääräistä täytäntöönpanoa

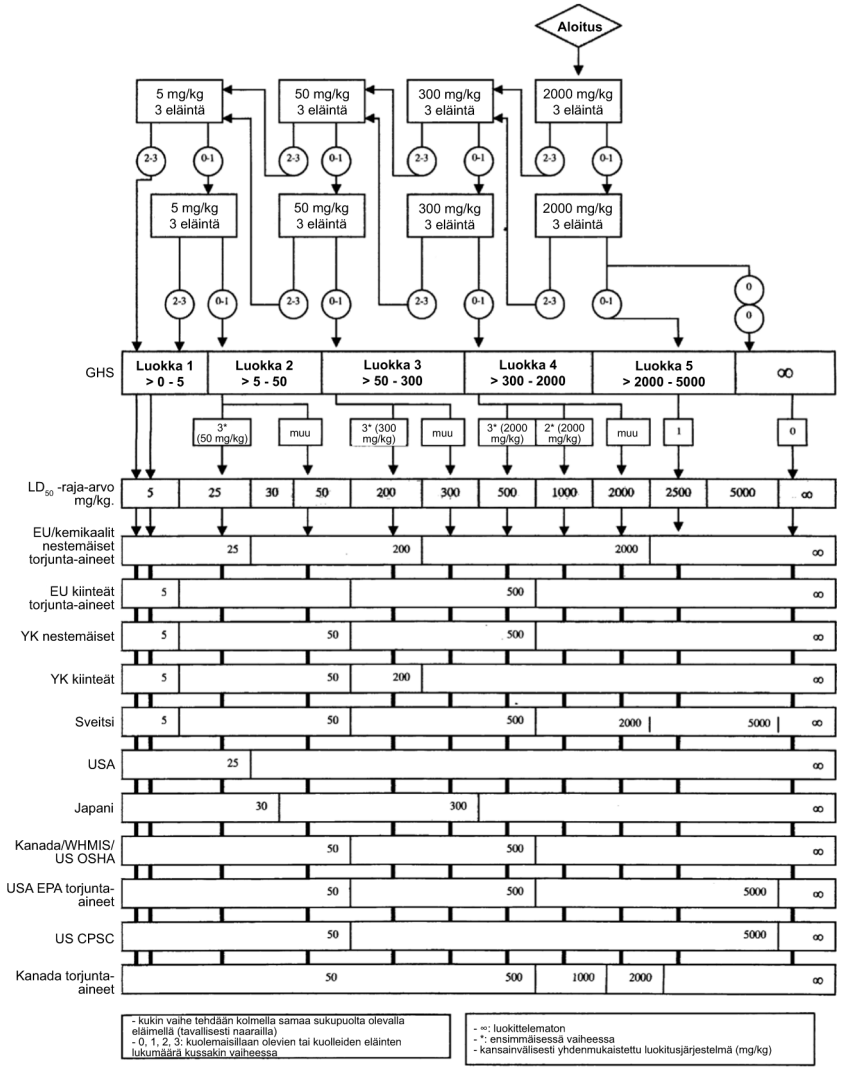
▼B



LIITE 3 (JATKOA 2)

KOEMENETELMÄ B.1 b: EU:n järjestelmän mukaiset luokitteluohjeet, joita käytetään siirtymäkaudella ennen kemikaalien kansainvälisesti yhdenmukaistetun järjestelmän (GHS) (viitteessä (8)) täysimääräistä täytäntöönpanoa

▼B



LIITE 3 (JATKOA 3)

KOEMENETELMÄ B.1 b: EU:n järjestelmän mukaiset luokitteluohjeet, joita käytetään siirtymäkaudella ennen kemikaalien kansainvälisesti yhdenmukaistetun järjestelmän (GHS) (viitteessä (8)) täysimääräistä täytäntöönpanoa

▼M4

B.2 AKUUTTI MYRKYLLISYYS (HENGITETTYNÄ)

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 403 (2009) (1). Alkuperäinen akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskeva testiohje nro 403 (TG 403) hyväksyttiin 1981. Tämän tarkistetun testimenetelmän B.2 (joka vastaa tarkistettua testiohjetta nro 403) tarkoituksena on lisätä joustavuutta, vähentää eläinten käyttöä ja täyttää sääntelyvaatimukset. Tarkistetussa testimenetelmässä on kaksi erityyppistä tutkimusta: perinteinen LC_{50}-protokolla ja pitoisuus × aika (C × t) -protokolla. Eräs tämän testimenetelmän tärkeimpiä ominaisuuksia on se, että sillä voidaan tuottaa pitoisuus-vaste-suhde, joka vaihtelee ei-tappavasta tappavaan. Sen perusteella voidaan johtaa mediaani tappava pitoisuus (LC_{50}), ei-tappavan pitoisuuden raja (esimerkiksi LC01) ja kulmakerroin. Lisäksi sen avulla voidaan tunnistaa mahdollinen sukupuoleen liittyvä herkkyys. C × t -protokollaa on käytettävä silloin, kun on sellainen erityinen sääntelyyn liittyvä tai tieteellinen tarve, jonka vuoksi eläimiä on testattava eripituisia aikoja. Tällaisia tarkoituksia ovat esimerkiksi hätäavun suunnittelu [esimerkiksi akuutin altistuksen ohjearvojen (AEGL-arvojen), hätäavun suunnitteluohjeiden (ERPG) tai akuuttien altistumisraja-arvojen (AETL-arvojen) johtamiseksi], tai maankäytön suunnittelu.

2. Tämän testimenetelmän mukaisten tutkimusten toteuttamista ja tulosten tulkintaa koskevat ohjeet ovat akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

3. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät ovat tämän luvun lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

4. Tämän testimenetelmän avulla voidaan toteuttaa testattavan kemikaalin luonnehdinta ja määrällinen riskinarviointi, ja testikemikaalit voidaan myös lajitella ja luokitella asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (3) mukaisesti. Ohjeasiakirja GD 39 (2) sisältää ohjeita akuuttia testausta varten tarvittavan asianmukaisen testimenetelmän valintaan. Kun tarvitaan vain luokitukseen ja merkintöihin liittyvää tietoa, on suositeltavaa lukea tämän liitteen (4) luku B.52 [katso GD 39 (2)]. Tätä testimenetelmää B.2 ei ole varsinaisesti tarkoitettu erikoismateriaalien, kuten huonosti liukenevien isometristen tai kuituisten materiaalien taikka teollisesti valmistettujen nanomateriaalien testaukseen.

ALUSTAVAT HUOMIOT

5. Ennen tämän testimenetelmän mukaista testausta testauslaboratorion on hankittava kaikki saatavilla olevat tiedot testikemikaalista, mukaan luettuina olemassa olevat tutkimukset (esimerkiksi tämän liitteen luku B.52 (4)). Niistä saatavat tiedot mahdollisesti tukevat lisätestien tekemättä jättämistä, jotta eläinten käyttö voidaan minimoida. Tietoihin, joista voi olla apua sopivimman lajin, kannan, sukupuolen, altistustavan ja asianmukaisten testipitoisuuksien valinnassa, sisältyvät testikemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -toksisuustestien tulokset, odotettavissa olevat käytöt ja ihmisten altistumisen mahdollisuus sekä saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista [katso GD 39 (2)].

▼M4

6. Syövyttävien ja/tai ärsyttävien testikemikaalien testausta sellaisina pitoisuuksina, joiden oletetaan aiheuttavan kovia tuskia tai stressiä, on vältettävä, mikäli mahdollista. Mahdollista syövyttävää/ärsyttävää vaikutusta on arvioitava asiantuntija-arvioiden avulla, ja arvion on perustuttava ihmisistä ja eläimistä kertyneeseen kokemukseen (esimerkiksi ei-syövyttävillä/ärsyttävillä pitoisuuksilla tehdyt toistuvan annostelun tutkimukset), olemassa oleviin *in vitro* -tietoihin (esimerkiksi tämän liitteen luvut B.40 (5) ja B.40a (6) tai OECD:n ohje TG 435 (7)), pH-arvoihin, samankaltaisia aineita koskeviin tietoihin tai muihin asiaankuuluviin tietoihin, jotta voidaan selvittää, voidaanko lisätestit jättää tekemättä. Tiettyjä sääntelyvaatimuksia (esimerkiksi hätäavun suunnittelutarkoituksia) varten tätä testimenetelmää voidaan käyttää eläinten altistamiseen tällaisille materiaaleille, koska näin tutkimuksen johtajalla tai päätutkijalla on mahdollisuus valita tavoitepitoisuudet. Tavoiteltujen pitoisuuksien ei tule aiheuttaa vakavia ärsyttäviä tai syövyttäviä vaikutuksia, mutta niiden on kuitenkin oltava riittävät, jotta saavutetaan sellaisia pitoisuus-vastesuhteita, joilla voidaan täyttää testin sääntelyyn liittyvät ja tieteelliset tavoitteet. Nämä pitoisuudet on valittava tapauskohtaisesti, ja pitoisuuden valinnalle on esitettävä myös perustelut [katso GD 39 (2)].

TESTIN PERIAATE

7. Tämän testimenetelmän B.2 tarkoituksena on tuottaa tarpeeksi tietoa testikemikaalin akuutista myrkyllisyydestä, jotta se voidaan luokitella, sekä tietoa aineen tappavuudesta (esimerkiksi $LC_{50,}$ LC_{01} ja kulmakerroin) toisen tai kummankin sukupuolen kannalta sen mukaan, mikä on tarpeen määrällisissä riskinarvioinneissa. Tämä testimenetelmä koostuu kahdesta menetelmästä. Ensimmäinen menetelmä on perinteinen protokolla, jossa eläinryhmät altistetaan rajapitoisuudelle (rajatesti) tai pitoisuuksien sarjalle vaiheittaisessa menettelyssä, jonka kestoksi on yleensä määritetty neljä tuntia. Myös muunpituisia altistuksia voidaan soveltaa tiettyihin sääntelytarkoituksiin. Toinen menetelmä on C × t -protokolla, jossa eläinryhmät altistetaan yhdelle pitoisuudelle (rajapitoisuus) tai sarjalle useita pitoisuuksia eripituisiksi ajoiksi.

8. Kuolemaisillaan olevat, selvästi kärsivät tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla, ja koetulosten tulkinnassa ne on otettava huomioon samalla tavalla kuin kokeessa kuolleet eläimet. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa 19 (8) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

9. On käytettävä terveitä, nuoria ja täysikasvuisia yleisesti käytettyjä koe-eläinkantoja. Suositeltavin laji on rotta, ja jos käytetään muita lajeja, sille on esitettävä perustelut.

Eläinten valmistelu

10. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Altistuspäivänä on käytettävä 8–12 viikon ikäisiä nuoria aikuisia eläimiä, joiden ruumiinpainon on oltava ± 20 prosenttia aiemmin altistettujen samanikäisten eläinten keskimääräisestä painosta kummankin sukupuolen osalta. Eläimet valitaan satunnaistetusti ja merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan. Eläimet pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Eläimet on totutettava myös testilaitteistoon vähän ennen testausta, sillä se vähentää uuteen ympäristöön tutustumisesta aiheutuvaa stressiä.

▼M4

Eläinten hoito

11. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suhteellinen ilmankosteus on pidettävä mielellään 30–70 prosentin välillä, mikä ei välttämättä ole mahdollista, jos kantaja-aineena käytetään vettä. Ennen altistuksia ja niiden jälkeen eläimet on eroteltava häkkeihin sukupuolen ja pitoisuuden mukaisiin ryhmiin, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia, ja määrä on pidettävä sellaisena, että kannibalismista ja tappelusta johtuvat hävikit voidaan minimoida. Jos eläimet altistetaan vain nasaalisesti, ne voi olla tarpeen totuttaa immobilisointiputkiin. Immobilisointiputket eivät saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta fyysistä, lämpöön tai liikkumattomuuteen liittyvää stressiä. Immobilisointi voi vaikuttaa fysiologisiin tutkittaviin ominaisuuksiin, kuten ruumiinlämpöön (hypertermia) ja/tai hengityksen minuuttitilavuuteen. Jos saatavilla on rinnakkaistietoja, jotka osoittavat, ettei tällaisia muutoksia juuri ilmene, immobilisointiputkiin totuttaminen ei ole tarpeen. Eläimet, jotka altistetaan aerosolille kokonaan, on laitettava kokeen ajaksi häkkiin yksittäin, jotta testattava aerosoli ei suodatu muiden häkissä olevien eläinten karvapeitteen kautta. Tavallista ja sertifioitua laboratorioruokavaliota voidaan käyttää muulloin paitsi altistuksen aikana, eikä tavallisen juomaveden määrää tule rajoittaa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää).

Inhalaatiokammiot

12. Testikemikaalin luonne ja testin tavoite on otettava huomioon inhalaatiokammiota valittaessa. Ensisijainen altistumistapa on vain nasaalisesti (tähän termiin kuuluvat myös altistustavat vain pään kautta, vain nasaalisesti tai vain nokan kautta). Vain nasaalista altistusta suositellaan yleensä tutkittaessa nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja sekä sellaisia höyryjä, jotka saattavat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Tutkimuksen tietyt tavoitteet voidaan saavuttaa paremmin käyttämällä koko kehoon kohdistuvaa altistusta, mutta se on perusteltava tutkimusraportissa. Jotta kammion ilma voidaan pitää vakaana koko kehon kammiossa, koe-eläinten viemä tila saa olla korkeintaan viisi prosenttia kammion tilavuudesta. Vain nasaalisesti ja koko kehon kautta tapahtuvan altistuksen tekniikoiden periaatteet sekä niiden erityiset hyödyt ja haitat on kuvattu ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

ALTISTUSOLOSUHTEET

Pitoisuuksien annostelu

13. Vain nasaalisesti -altistukset rotilla voivat kestää enintään kuusi tuntia. Jos hiiriä altistetaan vain nasaalisesti, altistusten kesto ei tavallisesti saa ylittää neljää tuntia. Jos tarvitaan pitempään kestäviä tutkimuksia, on esitettävä perustelut [katso GD 39 (2)]. Eläimille, joita altistetaan aerosoleille koko kehon kammioissa, on järjestettävä oma häkki sen estämiseksi, etteivät muut häkissä olevat eläimet niele testikemikaalia, kun ne nuolevat toistensa turkkia. Eläimiä ei saa ruokkia altistusjakson aikana. Vettä saa antaa koko kehoon kohdistuvan altistuksen ajan.

14. Eläimet altistetaan testikemikaalille, kun se on kaasuna, höyrynä, aerosolina tai niiden sekoituksena. Testattava fyysinen olomuoto määräytyy testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, valitun pitoisuuden ja/tai testikemikaalin käsittelyssä ja käytössä todennäköisen fyysisen muodon perusteella. Hygroskooppiset ja kemiallisesti reaktiiviset testikemikaalit on testattava kuivaa ilmaa käyttäen. Räjähtävien pitoisuuksien tuottamista on vältettävä huolellisesti.

▼M4

Hiukkaskokojakauma

15. Hiukkasten koko on mitattava kaikista aerosoleista ja sellaisista höyryistä, jotka voivat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Jotta kaikki hengityselimistön oleelliset osat altistuvat aineelle, on suositeltavaa käyttää aerosoleja, joiden massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) on 1–4 μm ja joiden geometrinen keskihajonta (σ_g) sijoittuu välille 1,5–3,0 (2) (9) (10). Tämä vaatimus on pyrittävä täyttämään kaikin keinoin, mutta jos se ei onnistu, on esitettävä asiantuntijan lausunto. Esimerkiksi metallihuurut voivat olla tätä vaatimusta pienempiä, kun taas varautuneet hiukkaset, kuidut ja hygroskooppiset materiaalit (joiden koko kasvaa hengitystie-elimistön kosteassa ympäristössä) voivat olla vaatimusta suurempia.

Testikemikaalin valmistelu kantaja-aineessa

16. Jotta ilmakehään saadaan testikemikaalista sopiva pitoisuus ja hiukkaskoko, voidaan käyttää kantaja-ainetta. Pääsääntöisesti on käytettävä vettä. Hiukkasmateriaaleja voidaan joutua käsittelemään mekaanisesti vaaditun hiukkaskokojakauman saavuttamiseksi, mutta se on tehtävä varovasti, jotta testikemikaali ei hajoa tai muutu. Jos mekaanisen prosessin oletetaan muuttaneen testikemikaalin koostumusta (esimerkiksi kitkan vuoksi liiallisen jauhamisen aiheuttamat hyvin korkeat lämpötilat), testikemikaalin koostumus on varmennettava analyyttisesti. Riittäviä varotoimia on noudatettava, jotta testikemikaali ei kontaminoidu. Murenemattomia raemateriaaleja, jotka on tarkoituksella valmistettu sellaisiksi, ettei niitä voi hengittää, ei tarvitse testata. Hankauskoe on tehtävä sen osoittamiseksi, ettei raemaisen materiaalin käsittelyssä synny hengitettäviä hiukkasia. Jos hankauskoe tuottaa hengitettäviä aineita, on tehtävä hengityksen kautta aiheutuvaa myrkyllisyyttä koskeva testi.

Verrokkieläimet

17. Samanaikaista negatiivista (ilma-) verrokkiryhmää ei tarvita. Jos testi-ilmakehän tuottamisessa käytetään apuna muuta kantaja-ainetta kuin vettä, kantaja-aineverrokkiryhmää on käytettävä ainoastaan silloin, kun saatavilla ei ole aiempia tietoja sisäänhengityksen kautta aiheutuvasta myrkyllisyydestä. Jos kantaja-aineessa valmistellun testikemikaalin myrkyllisyystutkimus osoittaa, ettei kemikaali ole myrkyllinen, se tarkoittaa, että kantaja-aine on myrkytön testattuna pitoisuutena, joten kantaja-aineverrokkia ei tarvita.

ALTISTUSOLOSUHTEIDEN SEURANTA

Kammion ilmavirtaus

18. Ilman virtausta kammion läpi on valvottava tarkasti ja seurattava jatkuvasti, ja sitä koskevat tiedot on kirjattava vähintään kerran tunnissa jokaisen altistuksen aikana. Testi-ilmakehän pitoisuuden (tai stabiiliuden) seuranta kuuluu olennaisena osana kaikkien dynaamisten parametrien mittaamiseen, ja se on myös epäsuora keino valvoa kaikkia oleellisia dynaamisia parametreja, joita tarvitaan ilmakehän tuottamiseen. Erityistä huomiota on kiinnitettävä siihen, että uudelleenhengittäminen vältetään vain nasaalisen altistuksen kammioissa niissä tapauksissa, kun altistusjärjestelmän läpi kulkeva ilmavirtaus ei riitä tuottamaan dynaamista testikemikaali-ilmakehän virtaa. On tiettyjä menetelmiä, joiden avulla voidaan osoittaa, ettei valituissa toimintaolosuhteissa tapahdu uudelleenhengittämistä (2) (11). Happipitoisuuden on oltava vähintään 19 prosenttia, eikä hiilidioksidipitoisuus saa ylittää yhtä prosenttia. Jos on aihetta olettaa, ettei näitä vaatimuksia voida täyttää, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet on mitattava.

▼M4

Kammion lämpötila ja suhteellinen kosteus

19. Kammion lämpötila on pidettävä välillä 22 ± 3 °C. Eläinten hengitysilman suhteellista kosteutta on seurattava sekä nasaalisissa että koko kehoon kohdistuvissa altistuksissa, ja se on kirjattava vähintään kolmesti enintään neljä tuntia kestävien altistusten osalta ja tunneittain lyhyempien altistusten osalta. Suhteellisen kosteuden tulisi olla välillä 30–70 prosenttia, mutta tämä ei ole välttämättä mahdollista (esimerkiksi testattaessa vesipohjaisia seoksia) tai mitattavissa, koska testikemikaali häiritsee testimenetelmää.

Testikemikaali: nimellispitoisuus

20. Aina kun mahdollista, altistuskammion nimellispitoisuus on laskettava ja kirjattava. Nimellispitoisuus on tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammiojärjestelmän läpi virtaavan ilman kokonaistilavuudella. Nimellispitoisuudella ei luonnehdita eläinten altistumista, vaan nimellispitoisuuden ja varsinaisen pitoisuuden vertailusta saadaan tietoa testijärjestelmän generointitehokkuudesta, ja sitä voidaan siis käyttää generointiongelmien havaitsemiseen.

Testikemikaali: todellinen pitoisuus

21. Todellinen pitoisuus on testikemikaalin pitoisuus eläinten hengitysilmassa inhalaatiokammiossa. Todelliset pitoisuudet saadaan tietyillä menetelmillä (esimerkiksi suoralla näytteenotolla, adsorptiivisilla tai kemiallisesti reaktiivisilla menetelmillä ja tulosten analyyttisella luonnehtimisella) tai muilla menetelmillä, kuten suodatukseen perustuvalla gravimetrisella analyysilla. Gravimetrisen analyysin käyttö on hyväksyttävää vain yksikomponenttisten jauhemaisten aerosolien tai heikosti haihtuvista nesteistä koostuvien aerosolien yhteydessä, ja sitä on tuettava asianmukaisella esitutkimuksella, jossa käsitellään testikemikaalia koskevia luonnehdintoja. Monikomponenttisten jauhemaisten aerosolien pitoisuus voidaan myös määrittää gravimetrisen analyysin avulla. Siihen tarvitaan kuitenkin analyysitietoja, jotka osoittavat, että ilmassa leijuvan materiaalin koostumus on sama kuin lähtömateriaalin. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, testikemikaali voi olla tarpeen analysoida uudelleen (mieluiten ilmassa leijuvassa muodossaan) säännöllisin väliajoin tutkimuksen aikana. Sellaisten aerosolisoituvien aineiden osalta, jotka voivat höyrystyä tai sublimoitua, on osoitettava, että valitulla menetelmällä kerättiin kaikki faasit. Tutkimusraportissa on ilmoitettava tavoitepitoisuus, nimellinen pitoisuus ja todellinen pitoisuus, mutta tilastollisissa analyyseissa käytetään vain todellisia pitoisuuksia tappavien pitoisuuksien arvoja laskettaessa.

22. Jos mahdollista, on käytettävä yksi erä testikemikaalia, ja testinäyte on säilytettävä sen puhtauden, homogeenisuuden ja stabiiliuden säilyttävissä olosuhteissa. Ennen tutkimuksen aloittamista testikemikaalista on laadittava luonnehdinta, johon on sisällyttävä sen puhtaus ja – mikäli teknisesti mahdollista – identiteetti sekä tunnistettujen kontaminanttien ja epäpuhtauksien määrät. Tämä voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavien tietojen avulla: retentioaika ja piikin suhteellinen pinta-ala sekä molekyylipaino, joka on saatu massaspektroskopialla tai kaasukromatografia-analyyseista, tai muut estimaatit. Vaikka testinäytteen identiteetti ei kuulu testauslaboratorion vastuulle, sen voi olla järkevää vahvistaa rahoittajan laatima luonnehdinta ainakin joiltain osin (esimerkiksi väri, fysikaalinen olomuoto jne.).

23. Altistusilmakehä on pidettävä mahdollisimman muuttumattomana, ja sitä on tarkkailtava jatkuvasti ja/tai ajoittain analyysimenetelmän mukaisesti. Jos näytteitä otetaan ajoittain, kammion ilmakehästä on otettava näytteitä vähintään kahdesti neljän tunnin tutkimuksen aikana. Jos se ei ole mahdollista vähäisen ilmanvirtauksen tai pienten pitoisuuksien vuoksi, koko altistusjakson ajalta voidaan ottaa yksi näyte. Jos näytteiden välillä ilmenee suurta vaihtelua, seuraavia pitoisuuksia testattaessa on otettava neljä näytettä kutakin altistusta kohti. Yksittäiset kammion pitoisuusnäytteet eivät saa poiketa

▼M4

keskimääräisestä pitoisuudesta enempää kuin ± 10 prosenttia kaasujen ja höyryjen osalta tai ± 20 prosenttia nestemäisten tai kiinteiden aerosolien osalta. Kammion tasapainotukseen kulunut aika (t_{95}) on laskettava ja kirjattava. Altistuksen kesto käsittää ajan, jolloin testikemikaali muodostetaan, mikä otetaan huomioon t_{95}-ajan saavuttamiseen tarvittavissa ajoissa. Ohjeita t_{95}-ajan arvioimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

24. Hyvin monimutkaisten, kaasuista/höyryistä koostuvien seosten ja aerosolien (esimerkiksi polttokammiot ja tietyn tarkoituksen mukaisten lopputuotteiden/-laitteiden perusteella kehitetyt testikemikaalit) osalta kukin faasi voi käyttäytyä inhalaatiokammiossa eri tavoin, joten jokaisesta faasista (kaasu/höyry ja aerosoli) on valittava vähintään yksi indikaattoriaine (analyytti), yleensä seoksen pääasiallinen vaikuttava aine. Kun testikemikaali on seos, on ilmoitettava seoksen analyyttinen pitoisuus, ei siis pelkästään vaikuttavan aineen tai komponentin (analyytin) pitoisuutta. Lisätietoja todellisista pitoisuuksista on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Testikemikaali: hiukkaskokojakauma

25. Aerosolien hiukkaskokojakauma on määritettävä vähintään kahdesti jokaisen neljän tunnin mittaisen altistuksen aikana käyttämällä kaskadierotinta tai jotain toista laitetta, kuten aerodynaamista hiukkaskokoluokittelijaa. Jos kaskadierottimella tai muulla laitteella saatujen tulosten välinen vastaavuus voidaan osoittaa, kyseistä muuta laitetta voidaan käyttää koko tutkimuksen ajan. Ensisijaisen laitteen rinnalla on käytettävä toissijaista laitetta, esimerkiksi gravimetrista suodatinta tai törmäytintä/kuplituslaitetta ensisijaisen laitteen keräystehon vahvistamiseksi. Hiukkaskoon analyysista saadun massapitoisuuden on sijoituttava kohtuullisessa määrin suodatusanalyysilla saadun massapitoisuuden rajoihin [katso GD 39 (2)]. Jos vastaavuus voidaan osoittaa tutkimuksen varhaisessa vaiheessa, myöhemmät vahvistavat mittaukset voidaan jättää tekemättä. Eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi on pyrittävä minimoimaan epävarmat tiedot, jotta altistusta ei tarvitse toistaa. Höyryjen osalta on määritettävä hiukkaskoko, jos on mahdollista, että höyryn tiivistyessä muodostuu aerosolia, tai jos höyrykammiossa, jossa faasien sekoittuminen on mahdollista, havaitaan hiukkasia (katso 15 kohta).

MENETTELY

26. Jäljempänä kuvataan kahdentyyppisiä tutkimuksia: perinteistä protokollaa ja C × t -protokollaa. Molemmat protokollat voivat sisältää esikokeen, päätutkimuksen ja/tai raja-annostestin (perinteinen protokolla) tai testauksen rajapitoisuudella (C × t). Jos yhden sukupuolen tiedetään olevan herkempi, tutkimuksen johtaja voi päättää suorittaa nämä tutkimukset käyttäen vain herkkää sukupuolta. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Ennen tutkimuksen aloittamista on otettava huomioon kaikki saatavilla olevat tiedot, jotta eläinten käyttö voidaan pitää mahdollisimman vähäisenä. Esimerkiksi tiedot, jotka on saatu hyödyntämällä tämän liitteen lukua B.52 (4), saattavat poistaa tarpeen toteuttaa esikoe, ja ne voivat myös osoittaa, onko jompikumpi sukupuoli toista herkempi [katso GD 39 (2)].

▼M4

PERINTEINEN PROTOKOLLA

Yleisiä huomioita: perinteinen protokolla

27. Perinteisessä tutkimuksessa ryhmä eläimiä altistetaan testikemikaalille tietyksi ajaksi (yleensä neljäksi tunniksi) joko nasaalisen altistuksen tai koko kehoon kohdistuvan altistuksen kammiossa. Eläimet altistetaan joko rajapitoisuudelle (rajatesti) tai vähintään kolmelle pitoisuudelle vaiheittaisessa menettelyssä (päätutkimus). Päätutkimusta voi edeltää esikoe, ellei testikemikaalista ole jo jonkin verran tietoa saatavilla, esimerkiksi aiemmin tehty luvun B.52 mukainen tutkimus [katso GD 39 (2)].

Esikoe: perinteinen protokolla

28. Esikoetta käytetään testikemikaalin vaikutuskyvyn arvioimisessa, sukupuolten välisten herkkyyserojen tunnistamisessa ja helpottamaan altistuksen pitoisuustasojen valintaa päätutkimukseen tai rajatestiin. Kun valitaan esikokeen pitoisuustasoja, on käytettävä kaikkea saatavilla olevaa tietoa, myös (Q)SAR-tietoja ja samanlaisia kemikaaleja koskevia tietoja. Kullekin pitoisuudelle saa altistaa enintään kolme urosta ja kolme naarasta (kolme eläintä / sukupuoli voi olla tarpeen sukupuolten välisen eron määrittämiseksi). Esikoe voi koostua yhdestä pitoisuudesta, mutta myös useampia pitoisuuksia voidaan testata, mikäli tarpeen. Esikokeessa ei tule kuitenkaan testata niin montaa eläintä ja pitoisuutta, että se alkaa muistuttaa päätutkimusta. Esikokeen sijasta voidaan käyttää aiemmin toteutettua luvun B.52 mukaista tutkimusta (4) [katso GD 39 (2)].

Rajatesti: perinteinen protokolla

29. Rajatestiä käytetään silloin, kun testikemikaalin tiedetään tai oletetaan olevan periaatteessa myrkytön eli aiheuttavan toksisen vasteen vain lakisääteistä rajapitoisuutta suuremmilla pitoisuuksilla. Rajatestissä altistetaan yksi ryhmä, jossa on kolme urosta ja kolme naarasta, rajapitoisuuden vahvuiselle testikemikaalille. Tietoa testikemikaalin myrkyllisyydestä voidaan hankkia samanlaisia testattuja kemikaaleja koskevista tiedoista, jolloin on otettava huomioon niiden komponenttien identiteetti ja prosenttiosuus, joilla tiedetään olevan toksikologista merkitystä. Tilanteissa, joissa tietoa testikemikaalin myrkyllisyydestä on vain vähän tai sitä ei ole lainkaan tai jos testikemikaalin oletetaan olevan myrkyllinen, on toteutettava päätutkimus.

30. Rajapitoisuudet valitaan yleensä sääntelyvaatimusten perusteella. Kun käytetään asetusta (EY) N:o 1272/2008, kaasujen, höyryjen ja aerosolien rajapitoisuudet ovat 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l (tai suurin mahdollinen pitoisuus) (3). Rajapitoisuuksien määrittäminen tietyille testikemikaaleille, etenkin höyryille ja aerosoleille, voi olla teknisesti haasteellista. Aerosolien testauksessa ensisijaisena tavoitteena tulee olla hengitettävän hiukkaskoon (MMAD 1–4 μm) saavuttaminen. Useimpien kemikaalien osalta tämä on mahdollista, kun niiden pitoisuus on 2 mg/l. Aerosolien testaamista suurempina pitoisuuksina kuin 2 mg/l on yritettävä vain, jos hengitettävä hiukkaskoko voidaan saavuttaa [katso GD 39 (2)]. Asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaan rajapitoisuuden ylittävien testien tekeminen ei ole suositeltavaa eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi (3). Rajapitoisuutta on harkittava vain, jos on erittäin todennäköistä, että sellaisen testin tulokset ovat suoraan merkityksellisiä ihmisten terveyden (3) suojelemisessa, ja tutkimusraportissa on esitettävä asiaa koskevat perustelut. Mahdollisesti räjähtäviä testikemikaaleja on käsiteltävä varovasti räjähdykselle suotuisien olosuhteiden välttämiseksi. Jotta vältetään eläinten tarpeeton käyttö, ennen rajatestiä on tehtävä testiajo ilman eläimiä sen varmistamiseksi, että rajatestin edellyttämät kammio-olosuhteet voidaan saavuttaa.

▼M4

31. Jos rajapitoisuudella havaitaan kuolleisuutta tai kuoleman lähestymistä, rajatestin tuloksia voidaan käyttää muiden, eri pitoisuuksilla tehtävien testien esikokeena (katso päätutkimus). Jos rajapitoisuuden tuottaminen ei ole mahdollista testikemikaalin fysikaalisten tai kemiallisten ominaisuuksien vuoksi, on testattava suurin mahdollinen pitoisuus. Jos kuolleisuus on alle 50 prosenttia suurimmalla mahdollisella pitoisuudella, lisätestaus ei ole tarpeen. Jos rajapitoisuutta ei voitu tuottaa, tutkimusraportissa on esitettävä sitä koskeva selvitys ja sitä tukevia tietoja. Jos höyryn suurin mahdollinen pitoisuus ei aiheuta myrkyllisyyttä, testikemikaalista voi olla tarpeen tuottaa nestemäinen aerosoli.

Päätutkimus: perinteinen protokolla

32. Päätutkimuksessa käytetään yleensä viittä urosta ja viittä naarasta (tai viittä herkän sukupuolen yksilöä, jos herkkyys tiedetään) pitoisuustasoa kohti. Pitoisuustasoja on oltava vähintään kolme. On käytettävä riittävän suuria pitoisuuksia, jotta voidaan laatia luotettava tilastollinen analyysi. Altistusryhmien välinen aika määritellään toksisten oireiden alkamishetken, keston ja vaikeusasteen mukaan. Eläinten altistusta seuraavalla pitoisuudella on lykättävä, kunnes on saatu riittävä varmuus jo testattujen eläinten eloonjäämisestä. Näin tutkimuksen johtaja voi mukauttaa seuraavan altistusryhmän tavoitepitoisuutta. Kehittyneiden tekniikoiden vuoksi tämä ei ole välttämättä käytännöllistä inhalaatiotutkimuksissa, joten eläinten altistamisen seuraavalla pitoisuustasolla on perustuttava aiempaan kokemukseen ja tieteelliseen arvioon. Seosten testaamisesta saa tietoa ohjeasiakirjasta GD 39 (2).

PITOISUUS × AIKA (C × T) -PROTOKOLLA

Yleisiä huomioita: C × t -protokolla

33. Vaiheittaista C × t -tutkimusta voidaan harkita vaihtoehdoksi perinteiselle protokollalle, kun arvioidaan aineen myrkyllisyyttä hengitettynä (12) (13) 14). Tämän lähestymistavan avulla eläimet voidaan altistaa testikemikaalille useilla pitoisuustasoilla ja eripituisiksi ajoiksi. Kaikki testit tehdään vain nasaaliseen altistukseen tarkoitetussa kammiossa (koko kehoon kohdistuvaan altistukseen tarkoitetut kammiot eivät ole käytännöllisiä tässä protokollassa). Tämä protokolla on kuvattu lisäyksessä 1 olevassa vuokaaviossa. Simulaatioanalyysi on osoittanut, että sekä perinteisellä protokollalla että C × t -protokollalla voidaan tuottaa luotettavia LC_{50}-arvoja, mutta että C × t -protokolla on yleisesti parempi luotettavien LC_{01}- ja LC_{10}-arvojen tuottamisessa (15).

34. Lisäksi simulaatioanalyysi on osoittanut, että kahden eläimen käyttäminen yhtä C × t -aikaväliä kohti (yksi kumpaakin sukupuolta, jos käytetään molempia sukupuolia, tai kaksi herkemmän sukupuolen edustajaa) saattaa olla riittävä, kun päätutkimuksessa testataan neljä pitoisuutta ja viisi altistuksen kestoa. Tietyissä olosuhteissa tutkimuksen johtaja voi päättää käyttää kahta rottaa kummastakin sukupuolesta yhtä C × t -aikaväliä kohti (15). Kahden eläimen käyttäminen kumpaakin sukupuolta kohti voi vähentää vinoumia ja estimaattien vaihtelevuutta, lisätä arvioinnin onnistumista ja parantaa luottamusvälin kattavuutta. Jos tiedot eivät kuitenkaan riitä arviointiin (kun käytetään yhtä eläintä sukupuolta kohti tai kahta herkemmän sukupuolen eläintä), viides altistuspitoisuus voi olla myös tarpeen. Lisätietoja eläinten määrästä ja käytettävistä pitoisuuksista C × t -tutkimuksessa on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

▼M4

Esikoe: C × t -protokolla

35. Esikokeella arvioidaan testikemikaalin vaikutuskykyä ja helpotetaan altistuksen pitoisuustasojen valintaa päätutkimusta varten. Jotta voidaan valita asianmukainen aloituspitoisuus päätutkimukseen ja minimoida käytettävien eläinten määrä, saatetaan tarvita esikoe, jossa käytetään enintään kolmea eläintä sukupuolta ja pitoisuutta kohti [katso tarkemmat tiedot ohjeasiakirjan GD 39 lisäyksestä III (2)]. Sukupuolten välisen eron määrittämiseksi voi olla tarpeen käyttää kolmea eläintä sukupuolta kohti. Nämä eläimet on altistettava yhden kerran, yleensä 240 minuutin ajaksi. Riittävien testi-ilmakehien tuottamisen mahdollisuus on arvioitava teknisissä esitesteissä ilman eläimiä. Yleensä esikoetta ei tarvita, jos kuolleisuustiedot ovat saatavilla luvun B.52 mukaisesta tutkimuksesta (4). Kun B.2-tutkimukseen valitaan alustavaa tavoitepitoisuutta, tutkimuksen johtajan on otettava huomioon saatavilla olevissa B.52-tutkimuksissa (4) havaitut kuolleisuusmallit kummankin sukupuolen ja kaikkien testattujen pitoisuuksien osalta [katso GD 39 (2)].

Alkupitoisuus: C × t -protokolla

36. Alkupitoisuus (altistuskerta I) (lisäys 1) on joko rajapitoisuus tai pitoisuus, jonka tutkimuksen johtaja on valinnut esikokeen perusteella. Ryhmät, joissa on yksi eläin sukupuolta kohti, altistetaan tälle pitoisuudelle eripituisiksi ajoiksi (esimerkiksi 15, 30, 60, 120 tai 240 minuuttia), jolloin eläinten kokonaismäärä on 10 (tätä ryhmää kutsutaan nimellä altistuskerta I) (lisäys 1).

37. Rajapitoisuudet valitaan yleensä sääntelyvaatimusten perusteella. Kun käytetään asetusta (EY) N:o 1272/2008, kaasujen, höyryjen ja aerosolien rajapitoisuudet ovat 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l (tai suurin mahdollinen pitoisuus) (3). Rajapitoisuuksien määrittäminen tietyille testikemikaaleille, etenkin höyryille ja aerosoleille, voi olla teknisesti haasteellista. Aerosoleja testattaessa tavoitteena on oltava kooltaan hengitettävä hiukkanen (esimerkiksi 1–4 μm:n MMAD) rajapitoisuudella 2 mg/l. Tämä on mahdollista useimpien kemikaalien osalta. Aerosolien testaamista suuremmalla pitoisuudella kuin 2 mg/l on yritettävä vain, jos on mahdollista saavuttaa kooltaan hengitettävä hiukkanen [katso ohjeasiakirja GD 39 (2)]. Asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaan rajapitoisuuden ylittävien testien tekeminen ei ole suositeltavaa eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi (3). Rajapitoisuuden ylittävää testausta on harkittava vain, jos on erittäin todennäköistä, että sellaisen testin tulokset ovat suoraan merkityksellisiä ihmisten terveyden (3) suojelemisessa, ja tutkimusraportissa on esitettävä perustelut. Mahdollisesti räjähtäviä testikemikaaleja on käsiteltävä varovasti räjähdykselle suotuisien olosuhteiden välttämiseksi. Jotta vältetään eläinten tarpeeton käyttö, ennen alkupitoisuudella testausta on tehtävä testiajo ilman eläimiä sen varmistamiseksi, että tämän pitoisuuden edellyttämät kammio-olosuhteet voidaan saavuttaa.

38. Jos alkupitoisuuteen havaitaan liittyvän kuolleisuutta tai kuoleman lähestymistä, tällä pitoisuudella saatuja tuloksia voidaan käyttää muiden, eri pitoisuuksilla tehtävien testien lähtökohtana (katso päätutkimus). Jos rajapitoisuuden tuottaminen ei ole mahdollista testikemikaalin fysikaalisten tai kemiallisten ominaisuuksien vuoksi, on testattava suurin mahdollinen pitoisuus. Jos kuolleisuus on alle 50 prosenttia suurimmalla mahdollisella pitoisuudella, lisätestaus ei ole tarpeen. Jos rajapitoisuutta ei voitu tuottaa, tutkimusraportissa on esitettävä sitä koskeva selvitys ja sitä tukevia tietoja. Jos höyryn suurin mahdollinen pitoisuus ei aiheuta myrkyllisyyttä, testikemikaalista voi olla tarpeen tuottaa nestemäinen aerosoli.

▼M4

Päätutkimus: C × t -protokolla

39. Päätutkimuksessa testattu alkupitoisuus (altistuskerta I) (lisäys 1) on joko rajapitoisuus tai pitoisuus, jonka tutkimuksen johtaja on valinnut esikokeen perusteella. Jos altistuskerran I aikana tai sen jälkeen on havaittu kuolleisuutta, vähimmäisaltistus (C × t), josta seuraa kuolema, ohjaa altistuskerran II pitoisuuden ja altistusjaksojen määrittämistä. Edellinen altistuskerta vaikuttaa jokaiseen seuraavaan altistuskertaan (katso lisäys 1).

40. Monien testikemikaalien osalta alkupitoisuudella saadut tulokset sekä kolme muuta altistuskertaa, jotka on toteutettu pienemmällä aikavälillä (esimerkiksi altistusjaksojen jaottelu geometrisesti peräkkäisten jaksojen välisen kertoimen mukaisesti, yleensä √2) riittävät C × t -kuolleisuussuhteen (15) määrittämiseen, mutta viidennen altistuspitoisuuden käyttämisestä voi olla jonkin verran hyötyä [katso lisäys 1 ja GD 39 (2)]. Lisätietoja C × t -protokollalla saatujen tulosten matemaattisesta käsittelystä on lisäyksessä 1.

HAVAINNOT

41. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti ja säännöllisesti altistumisjakson aikana. Altistuksen jälkeen kliinisiä havaintoja on tehtävä vähintään kahdesti altistuspäivän aikana tai useammin, jos eläinten vaste käsittelyyn antaa siihen aihetta, ja vähintään kerran päivässä sen jälkeen yhteensä 14 päivän ajan. Havaintojakson pituus ei ole kiinteä, vaan se on määritettävä kliinisten merkkien luonteen ja alkamisajankohdan sekä toipumisajan pituuden perusteella. Ne ajankohdat, jolloin myrkyllisyyden merkit ilmaantuvat ja häviävät, ovat tärkeitä varsinkin, jos myrkyllisyyden merkit ilmaantuvat viipeellä. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti jokaisesta eläimestä erikseen. Kuolevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet ja/tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti eläinten hyvinvointiin liittyvien periaatteiden vuoksi. Kun tutkitaan myrkyllisyyden kliinisiä merkkejä, on kiinnitettävä huomiota siihen, ettei altistusmenettelystä johtuvaa huonoa ulkonäköä ja ohimeneviä muutoksia hengityksessä pidetä erehdyksessä merkkeinä kemikaaliin liittyvästä myrkyllisyydestä, jolloin eläimet pitäisi lopettaa ennenaikaisesti. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa ohjeasiakirjassa (GD 19) esitetyt periaatteet ja perustelut on otettava huomioon (7). Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

42. Häkin vieressä tehtyihin havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, autonomisen hermoston ja keskushermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Mikäli mahdollista, paikallisten ja systeemisten vaikutusten väliset erot on merkittävä muistiin. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljenerityksen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Lämmön mittaaminen peräsuolesta voi antaa vahvistavaa näyttöä refleksinomaisesta bradypneasta tai käsittelyyn tai ahtaaseen tilaan liittyvästä tai hypo-/hypertermiasta.

Ruumiinpainot

43. Kunkin eläimen paino on kirjattava kerran sopeutumisvaiheen aikana, altistuspäivänä ennen altistusta (päivä 0) ja vähintään päivinä 1, 3 ja 7 (ja myöhemmin viikoittain) sekä kuolinhetkellä tai lopettamisen yhteydessä, jos se tapahtuu päivän 1 jälkeen. Ruumiinpaino on tunnetusti erittäin tärkeä myrkyllisyyden indikaattori, joten eläimiä, joiden paino on jatkuvasti vähintään 20 prosenttia pienempi kuin ennen tutkimusta mitatut arvot, on seurattava tarkasti. Elossa olevat eläimet punnitaan ja lopetetaan humaanisti altistumisen jälkeisen jakson lopussa.

▼M4

Patologia

44. Kaikki koe-eläimet, myös kokeen aikana kuolleet tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi lopetetut ja tutkimuksesta poistetut, avataan. Jos ruumiinavausta ei voida tehdä heti kuolleen eläimen löytämisen jälkeen, eläintä on säilytettävä riittävän kylmässä lämpötilassa (ei pakastimessa) autolyysin minimoimiseksi. Ruumiinavaukset on tehtävä mahdollisimman pian, yleensä yhden tai kahden päivän kuluessa. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata, ja erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteissä oleviin muutoksiin.

45. Myös tutkimussuunnitelmaan ennalta sisällytettyjen lisätutkimusten käyttöä voidaan harkita tutkimuksen tulkinnallisen arvon lisäämiseksi. Tällaisia tutkimuksia ovat esimerkiksi eloonjääneiden rottien keuhkojen painon punnitseminen ja/tai todisteiden hankkiminen ärsyttävyydestä hengitysteiden mikroskooppitutkimuksella. Tutkittaviin elimiin voi sisältyä myös vähintään 24 tuntia hengissä säilyneiden eläinten makroskooppisia muutoksia sisältävät elimet ja elimet, joissa tiedetään tai oletetaan olevan kemikaalin aiheuttamia vaikutuksia. Koko hengityselimistön mikroskooppitutkimus voi antaa hyödyllistä tietoa veden kanssa reagoivista testikemikaaleista, kuten hapoista ja hygroskooppisista testikemikaaleista.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

46. Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot ruumiinpainoista ja ruumiinavaustuloksista on esitettävä. Kliiniset havaintotiedot tulee esittää yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin testiryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, myrkyllisyyden oireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, myrkyllisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset.

Testiraportti

47. Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet ja niiden hoito

— kuvaus häkkiolosuhteista, mukaan luettuina seuraavat tiedot: yhdessä häkissä olevien eläinten lukumäärä (tai lukumäärän muutos), alustamateriaali, lämpötila ja suhteellinen kosteus, valoisa aika ja tiedot ravinnosta

— käytetyt lajit/kanta ja perustelu muun lajin kuin rotan käyttämiselle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— satunnaistamismenetelmä

— tiedot ruoan ja veden laadusta (sekä ravinnon tyyppi/lähde, veden lähde)

— kuvaus testiä edeltäneestä tilanteesta ja tiedot ravinnosta, karanteenista ja sairauden hoidosta.

▼**M4**

Testikemikaali

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (mukaan luettuna isomeria)

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään.

Kantaja-aine

— perustelut kantaja-aineen käyttämiselle ja sen valinnalle (jos se on muu kuin vesi)

— aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saadut tiedot, jotka osoittavat, ettei kantaja-aine vaikuta tutkimuksen tulokseen.

Inhalaatiokammio

— kuvaus inhalaatiokammiosta sekä sen mitat ja tilavuus

— kuvaus eläinten altistukseen ja ilmakehän tuottamiseen käytetystä laitteistosta ja sen alkuperä

— lämmön, kosteuden, hiukkaskoon ja todellisen pitoisuuden mittauslaitteet

— ilmanlähde, tulo- ja poistoilman käsittely sekä ilmanvaihtojärjestelmä

— menetelmät, joilla laitteisto on kalibroitu yhtenäisen testi-ilmakehän varmistamiseksi

— paine-ero (yli- vai alipaine)

— kunkin kammion altistusportit (vain nasaalinen altistus); eläinten sijainti järjestelmässä (koko kehoon kohdistuva altistus)

— testi-ilmakehän ajallinen yhtenäisyys/stabiilius

— lämpötila- ja kosteusantureiden sekä testi-ilmakehän näytteenottopaikan sijainti kammiossa

— ilman virtausnopeudet, ilman virtausnopeus kussakin altistusportissa (vain nasaalinen altistus) tai eläinkuorma/kammio (koko kehoon kohdistuva altistus)

— tiedot hapen ja hiilidioksidin mittauslaitteistosta, jos tarpeen

— inhalaatiokammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95})

— tilavuuden muutosten määrä tunneittain

— annostelulaitteet (tarvittaessa).

Altistustiedot

— päätutkimuksen tavoitepitoisuuden valinnan peruste

— nimellispitoisuudet (altistuskammioon tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammion läpi virtaavan ilman tilavuudella)

— eläinten hengitysilmasta kerätyt testikemikaalin todelliset pitoisuudet; epäyhtenäisiä fyysisiä muotoja (kaasuja, höyryjä, aerosoleja) tuottavien seosten osalta jokainen voidaan analysoida erikseen

▼M4

— kaikki ilmapitoisuudet on ilmoitettava massayksikköinä (esimerkiksi mg/l, mg/m^3, etc.), tilavuusyksiköt (esimerkiksi ppm, ppb jne.) voidaan ilmoittaa sulkeissa

— hiukkaskokojakauma, massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (σg) sekä niiden laskentamenetelmät yksittäiset hiukkaskokoanalyysit on myös esitettävä.

Testiolosuhteet

— tiedot testikemikaalin valmistelusta, mukaan luettuina tiedot kiinteiden materiaalien hiukkaskoon pienentämisessä tai testikemikaaliliuosten valmistamisessa käytetyistä menetelmistä Jos mekaaniset prosessit ovat voineet muuttaa kemiallista koostumusta, on ilmoitettava analyysien tulokset testikemikaalin koostumuksen vahvistamiseksi.

— kuvaus (mieluiten kaavio) testi-ilmakehän tuottamiseen ja eläinten altistamiseen testi-ilmakehälle käytetystä laitteistosta

— tiedot käytetystä kemiallisesta analyysimenetelmästä ja sen validointimenetelmästä (myös tiedot siitä, miten tehokasta testikemikaalin saanto oli näytteenottokohdasta)

— testipitoisuuksien valintaperuste.

Tulokset

— kammion lämpötila, kosteus ja ilmanvirtaus (taulukkomuodossa)

— tiedot nimellisistä ja todellisista pitoisuuksista kammiossa (taulukkomuodossa)

— hiukkaskokotiedot sekä analyyttiset tiedot näytteen keräämisestä, hiukkaskokojakaumasta ja MMAD-arvon ja σ_g-arvon laskelmat (taulukkomuodossa)

— vastetiedot ja pitoisuustaso jokaisesta eläimestä (ts. eläimet, jotka osoittivat merkkejä myrkyllisyydestä, ja tiedot kuolleisuudesta sekä vaikutusten luonteesta, vaikeusasteesta, alkamisajankohdasta ja kestosta) (taulukkomuodossa)

— tutkimuksen aikana kerätyt tiedot yksittäisten eläinten ruumiinpainoista, kuolinpäivä ja -aika, jos se tapahtui ennen suunniteltua lopetusta, kunkin eläimen toksisuusoireiden alkamisajankohta ja niiden mahdollinen palautuminen

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla

— kuolleisuusestimaatit (esimerkiksi LC_{50}, LD_{01}) sekä 95 prosentin luottamusrajat ja kulmakerroin (jos se on voitu laskea arviointimenetelmällä)

— tilastollinen suhde ja eksponentin n estimaatti (C × t -protokolla) käytetyn tilasto-ohjelman nimi.

▼M4

Tulosten pohdinta ja tulkinta

— On kiinnitettävä erityistä huomiota niiden menetelmien kuvaukseen, joita tämän testimenetelmän vaatimusten (esimerkiksi rajapitoisuus tai hiukkaskoko) täyttämisessä käytettiin.

— Hiukkasten hengitettävyyttä on käsiteltävä kaikkien löydösten kannalta etenkin, jos hiukkaskokoon liittyvää kriteeriä ei voitu täyttää.

— Jos kärsiviä tai voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä merkkejä osoittavia eläimiä oli lopetettava humaanisti eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (8) olevien perustelujen mukaisesti, siitä on esitettävä selvitys.

— Jos tämän liitteen luvun B.52 (4) mukainen testaus keskeytettiin tämän testimenetelmän (B.2) puoltamiseksi, sille on esitettävä perustelut.

— Tutkimuksen kokonaisarviointiin on sisällytettävä tiedot nimellisten ja todellisten pitoisuuksien määrittelemiseen käytettyjen menetelmien yhtenäisyydestä sekä todellisen ja nimellisen pitoisuuden suhde.

— Raportissa on käsiteltävä myös todennäköistä kuolinsyytä ja pääasiallista vaikutustapaa (systeeminen vs. paikallinen).

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

3) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

4) Tämän liitteen luku B.52: Akuutti myrkyllisyys hengitettynä – akuutin toksisuuden luokittelua koskeva menetelmä (ATC-menetelmä)

5) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* ihosyövyttävyys: Ihon sähkövastusmääritystesti (TER).

6) Tämän liitteen luku B.40 a *In vitro* ihosyövyttävyys: Ihmisihomallitesti.

7) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321–327.

10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278–290,

13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105–117.

14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65–71.

15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/test-guidelines]

16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

Lisäys 1

C × t -protokolla

1. Vaiheittaista pitoisuus × aika (C × t) -tutkimusta voidaan harkita vaihtoehdoksi perinteiselle protokollalle, kun arvioidaan aineen myrkyllisyyttä hengitettynä (12) (13) 14). Sitä on käytettävä ensisijaisesti silloin, kun on erityinen sääntelyyn liittyvä tai tieteellinen tarve, jonka vuoksi eläimiä on testattava eripituisia aikoja, esimerkiksi hätäavun tai maankäytön suunnitteluun liittyviä tarkoituksia varten. Tämä lähestymistapa alkaa yleensä rajapitoisuudella testaamisella (altistuskerta I), jolloin eläimet altistetaan testikemikaalille viideksi eripituiseksi ajaksi (esimerkiksi 15, 30, 60, 120 ja 240 minuutiksi). Toisin sanoen yhdellä altistuskerralla saadaan tietoa eripituisista altistusajoista (katso kuva 1). Kun käytetään asetusta (EY) N:o 1272/2008, kaasujen, höyryjen ja aerosolien rajapitoisuudet ovat 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l. Nämä rajat saa ylittää vain, jos on sääntelyyn liittyvä tai tieteellinen tarve testata näitä suuremmilla pitoisuuksilla (katso 37 kohta luvun B.2 päätekstissä).

2. Jos testikemikaalin myrkyllisyydestä on vain vähän tietoa tai jos sitä ei ole lainkaan, on toteutettava esikoe, jossa enintään kolme eläintä sukupuolta kohti altistetaan tutkimuksen johtajan valitsemille tavoitepitoisuuksille yleensä 240 minuutin ajaksi.

3. Jos altistuskerralla I testataan rajapitoisuutta ja jos siinä yhteydessä havaitaan alle 50 prosentin kuolleisuus, lisätestit eivät ole tarpeen. Jos on sääntelyyn liittyvä tai tieteellinen tarve määrittää pitoisuus-/aika-/vastesuhde saatua rajapitoisuutta suuremmilla pitoisuuksilla, seuraava altistus on tehtävä suuremmalla pitoisuudella, joka on kaksi kertaa rajapitoisuus (ts. 2L kuvassa 1).

4. Jos rajapitoisuuden yhteydessä havaitaan myrkyllisyyttä, lisätestaus (päätutkimus) on tarpeen. Nämä lisäaltistukset toteutetaan joko pienemmillä pitoisuuksilla (kuvassa 1: altistuskerrat II, III tai IV') tai suuremmilla pitoisuuksilla käyttäen lyhyempiä altistusaikoja (kuvassa 1: altistuskerta IV) siten, että aikoja mukautetaan tai että niiden välinen aika on lyhyempi.

5. Testi (alkupitoisuus ja muut pitoisuudet) toteutetaan käyttämällä yhtä eläintä sukupuolta kohti kutakin pitoisuutta/aikapistettä kohti tai kahta herkemmän sukupuolen eläintä kutakin pitoisuutta/aikapistettä kohti. Tietyissä olosuhteissa tutkimuksen johtaja voi valita käyttää kahta rottaa sukupuolta kohti kutakin pitoisuutta/aikapistettä kohti (tai neljää herkemmän sukupuolen eläintä kutakin pitoisuutta/aikapistettä kohti) (15). Kahden eläimen käyttäminen kumpaakin sukupuolta kohti yleensä vähentää vinoumia ja estimaattien vaihtelevuutta, lisää arvioinnin onnistumista ja parantaa tässä kuvattuun protokollaan liittyvän luottamusvälin kattavuutta. Lisätietoja on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

6. Kukin altistuskerta toteutetaan mielellään yhtenä päivänä. Tämän ansiosta seuraavaa altistusta voidaan lykätä, kunnes on saatu riittävä varmuus jo testattujen eläinten eloonjäämisestä, ja tutkimuksen johtaja voi myös muuttaa seuraavan altistuskerran tavoitepitoisuutta ja altistuksen kestoa. Kukin altistuskerta on suositeltavaa aloittaa sillä ryhmällä, joka altistuu pisimpään, eli ensin 240 minuutin altistusryhmä, seuraavaksi 120 minuutin altistusryhmä ja niin edelleen. Jos esimerkiksi 240 minuutin ryhmän eläimet kuolevat 90 minuutin kuluttua tai osoittavat vakavia merkkejä myrkyllisyydestä (esimerkiksi suuria muutoksia hengityksessä, kuten vaivalloista hengittämistä), ei ole mielekästä altistaa ryhmää 120 minuutin ajaksi, koska kuolleisuus olisi todennäköisesti 100 prosenttia. Tällöin tutkimuksen johtajan on valittava kyseiselle pitoisuudelle lyhyempikestoiset altistukset (esimerkiksi 90, 65, 45, 33 ja 25 minuuttia).

▼M4

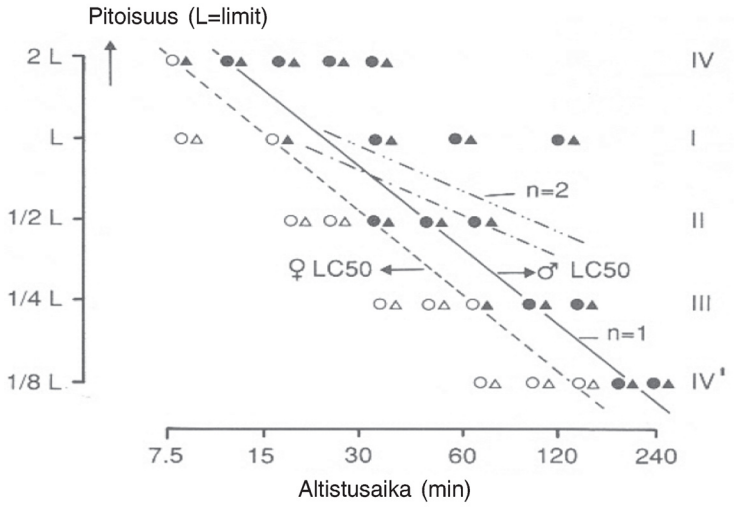
7. Kammion pitoisuudet on mitattava säännöllisesti, jotta kunkinpituisen altistuksen aikapainotettu keskimääräinen pitoisuus voidaan määrittää. Aina kun mahdollista, tilastollisessa analyysissa on käytettävä kunkin eläimen kuolinaikaa (pikemmin kuin altistuksen kestoa).

8. Neljän ensimmäisen altistuskerran tulokset on analysoitava, jotta voidaan tunnistaa pitoisuus-aikakäyrästä puuttuvat tiedot (katso kuva 1). Jos käyrä ei kuvaa tietoja riittävästi, voidaan toteuttaa ylimääräinen altistus (viides pitoisuus). Viidennen altistuksen pitoisuus ja kesto on valittava siten, että puuttuvat tiedot voidaan tuottaa.

9. Kaikkia altistuskertoja (myös ensimmäistä altistuskertaa) käytetään laskettaessa pitoisuus-aika-vaste-suhdetta tilastollista analyysia hyödyntäen (16). Mikäli mahdollista, kutakin C × t -väliä kohti on käytettävä aikapainotettua keskimääräistä pitoisuutta ja altistuksen kestoa kuolemaan saakka (jos eläin kuolee altistuksen aikana).

Kuva 1

Hypoteettinen kuvaus pitoisuus-aika-kuolleisuussuhteesta rotilla.



Vaaleat symbolit = eloonjääneet, mustat symbolit = kuolleet eläimet

Kolmio = naaras, neliö = uros

Yhtenäinen viiva = LC_{50}-arvot (vaihteluväli 7,5–240 min), urokset, n = 1

Katkoviiva = LC_{50}-arvot (vaihteluväli 7,5–240 min), naaraat, n = 1

Pisteviivat = hypoteettiset LC_{50}-arvot uroksille ja naaraille, jos n olisi ollut 2 (12).

Sanasto

Pitoisuus:

Altistusaika:

▼M4

10. Jäljempänä on esimerkki vaiheittaisesta menettelystä:

Altistuskerta I – Testaus rajapitoisuudella (katso kuva 1)

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä ([a])

— Tavoitepitoisuus ([b]) = rajapitoisuus.

— Altista viisi eläinryhmää tälle tavoitepitoisuudelle 15, 30, 60, 120 ja 240 minuutin ajaksi.

↓

Altistuskerta II ([c]) – Päätutkimus

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä 10 eläintä.

— Altista viisi eläinryhmää pienemmälle pitoisuudelle ([d]) (1/2 L) hieman pidemmäksi aikaa (kertoimen √2 mukaan porrastettuna, katso kuva 1).

↓

Altistuskerta III – Päätutkimus

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä 10 eläintä.

— Altista viisi eläinryhmää pienemmälle pitoisuudelle ([d]) (1/4 L) hieman pidemmäksi aikaa (kertoimen √2 mukaan porrastettuna, katso kuva 1).

↓

Altistuskerta IV' – Päätutkimus

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä 10 eläintä.

— Altista viisi eläinryhmää pienemmälle pitoisuudelle ([d]) (1/8 L) hieman pidemmäksi aikaa (kertoimen √2 mukaan porrastettuna, katso kuva 1).

tai

([a]) Jos tietoja sukupuolikohtaisesta herkkyydestä ei ole, käytetään sekä uros- että naarasrottia, ts. yksi eläin kumpaakin sukupuolta pitoisuutta kohti. Olemassa olevien tietojen perusteella – tai jos tämän altistuskerran aikana käy ilmi, että jompikumpi sukupuoli on herkempi – käytetään 10:tä herkemmän sukupuolen eläintä (kaksi eläintä pitoisuutta/aikapistettä kohti) jokaisella pitoisuustasolla testauksen seuraavissa vaiheissa. 10 eläintä.

([b]) Kun käytetään asetusta (EY) N:o 1272/2008, kaasujen, höyryjen ja aerosolien rajapitoisuudet ovat 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l. Oletetun myrkyllisyyden tai esikokeen tulosten perusteella on valittava pienemmät aloituspitoisuudet. Sääntelyyn liittyvien tai tieteellisten tarpeiden yhteydessä voidaan käyttää suurempia pitoisuuksia.

([c]) Eläinten altistusta seuraavalle pitoisuudelle on lykättävä, kunnes on saatu riittävä varmuus jo testattujen eläinten eloonjäämisestä. Näin tutkimuksen johtaja voi mukauttaa seuraavan altistusryhmän tavoitepitoisuutta ja altistuksen kestoa.

([d]) Pienintä annosta (pitoisuus x aika), joka aiheutti kuolleisuutta alkupitoisuudella testattaessa (ensimmäinen altistuskerta), käytetään ohjenuorana määritettäessä seuraavaa pitoisuuden ja altistuksen keston yhdistelmää. Yleensä pitoisuutta pienennetään kaksinkertaisesti (1/2 L), ja eläimet altistetaan uudelle aikavälille, jota on tarkennettu siten, että altistusajat on jaettu kertoimella 1,4 (√2; katso viite 11) ensimmäisen altistuksen yhteydessä havaittuun pienimpään tappavaan annokseen (aika × pitoisuus) liittyvän ajan mukaisesti. Tässä kuvassa (kuva 1) altistuskerralla 1 havaittiin kuolleisuutta 15 minuutin kohdalla, joten altistuskerran II kestot sijoitetaan tällöin 30 minuutin ympärille, ja ne ovat 15, 21, 30, 42 ja 60 minuuttia. Kahden ensimmäisen altistuksen jälkeen on erittäin suositeltavaa piirtää tiedoista edellä olevan kuvan kaltainen kuva ja tarkistaa, onko pitoisuuden ja ajan välinen kulma 45 astetta (n = 1) vai onko pitoisuus-aika-vastesuhde loivempi (esimerkiksi N = 2) vai jyrkempi (esimerkiksi n = 0,8). Jälkimmäisissä tapauksissa on erittäin suositeltavaa muuttaa seuraavia pitoisuuksia ja kestoja vastaavasti.

▼M4

Altistuskerta IV – Päätutkimus

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä 10 eläintä.

— Altista viisi eläinryhmää suuremmalle pitoisuudelle [e] (2 L) hieman lyhyemmäksi aikaa (kertoimen √2 mukaan porrastettuna, katso kuva 1).

C × t -protokollalla saatujen tulosten matemaattinen käsittely

11. C × t -menettely, jossa on neljä tai viisi altistuspitoisuutta ja viisi kestoa, tuottaa 20 tai 25 datapistettä. Näiden datapisteiden avulla C × t -suhde voidaan laskea käyttämällä tilastollista analyysia (16):

Kaava 1

$$Probitti(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

jossa C = pitoisuus; t = altistuksen kesto, tai

Kaava 2

$$Vaste = f(C^n t)$$

jossa $n = b_1/b_2$.

Kaavan 1 avulla LC_{50}-arvo voidaan laskea tietylle ajanjaksolle (esimerkiksi neljä tuntia, yksi tunti, 30 minuuttia tai mikä tahansa ajanjakso testatuilta ajanjaksoilta) käyttäen arvoa P = 5 (50 prosentin vaste). Haberin sääntöä voidaan soveltaa vain, kun n = 1. LC_{01}-arvo voidaan laskea käyttäen arvoa P = 2,67.

[e] Tietyissä tapauksissa voi olla tarpeen suurentaa pitoisuutta (2 L) uuden, vieläkin tarkemman aikavälin mukaisesti siten, että altistusajat jaetaan geometrisesti kertoimella 1,4 (√2) sen ajan mukaisesti, jolloin ensimmäisessä altistuksessa havaittiin pienin tappava pitoisuus. Altistuksen vähimmäiskeston on mielellään oltava yli viisi minuuttia, kun taas enimmäiskesto ei saa ylittää kahdeksaa tuntia.

▼B

B.3. **AKUUTTI MYRKYLLISYYS (IHON KAUTTA)**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Ainetta levitetään useaan ryhmään jaettujen eläinten iholle porrastettuina annoksina (yksi annos ryhmää kohti). Tämän jälkeen eläimiä tarkkaillaan oireiden ja kuolemien suhteen. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu.

Eläimet, joilla on vakavia ja pitkittyneitä ahdistuneisuuden ja kivun oireita, voidaan tarvittaessa lopettaa. Testattavia aineita ei tarvitse antaa tavalla, jonka tiedetään aiheuttavan selvää kipua ja ahdistusta syövyttävien tai ärsyttävien ominaisuuksien vuoksi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Ennen testiä eläinten elinolosuhteet pidetään tietyntyyppisinä vähintään viiden päivän ajan testin suorittamista silmälläpitäen. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan käsittelyryhmiin. Noin 24 tuntia ennen testiä turkki leikataan tai ajetaan eläinten selkäalueelta varoen naarmuttamasta ihoa, koska naarmut saattaisivat muuttaa ihon läpäisevyyttä. Vähintään 10 % ihoa peittävästä karvasta on ajeltava tai leikattava. Kiinteät aineet voidaan tarvittaessa jauhaa, ja ne on kosteutettava riittävällä vesimäärällä tai tarvittaessa muulla liuottimella hyvän ihokontaktin varmistamiseksi. Jos käytetään liuotinta, on otettava huomioon liuottimen vaikutus aineen imeytymiseen iholta. Nestemäisiä aineita käytetään yleensä laimentamattomina.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Koe-eläiminä voidaan käyttää aikuisia rottia tai kaneja. Muiden lajien käyttö on perusteltava. Testiin käytetään yleisiä laboratoriokantoja. Testin alussa kumpaakaan sukupuolta edustavien eläinten painonvaihtelut eivät saa olla enempää kuin ± 20 % sukupuolen keskiarvosta.

▼B

1.6.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Jokaista annostasoa kohti tarvitaan vähintään viisi eläintä, joiden on oltava samaa sukupuolta. Jos käytetään naaraita, ne eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä. Jos on käytettävissä tietoja, joiden mukaan jompikumpi sukupuoli on selvästi toista herkempi, kokeessa on käytettävä tätä sukupuolta.

Huomautus: Käytettäessä rottaa kehittyneempiä eläimiä akuutin myrkyllisyyden testauksia varten on harkittava pienempää eläinmäärää kuin rottien kohdalla. Annokset valitaan huolella, ja kohtuullisen myrkyllisten annosten ylittämistä on vältettävä kaikin keinoin. Tällaisissa kokeissa on vältettävä tappavien annosten antamista.

1.6.2.3 *Annostasot*

Annostasoja on oltava tarpeellinen määrä, kuitenkin vähintään kolme. Annostasot jaetaan siten, että saadaan jakauma myrkytysoireiden ja kuolleisuuden suhteen. Annostasojen valinnassa on otettava huomioon mahdolliset ärsyttävät tai syövyttävät ominaisuudet. Tietojen perusteella tulisi voida piirtää pitoisuus/kuolleisuus-käyrä, ja LC_{50}-arvo tulisi määrittää aina kun se vain on mahdollista.

1.6.2.4 *Rajatesti*

Voidaan tehdä yhden annostason rajatesti (vähintään 2 000 mg/kg) viiden koiraan ja viiden naaraan ryhmälle edellä kuvattujen menetelmien mukaisesti. Jos aineeseen liittyvää kuolleisuutta esiintyy, on harkittava kattavaa testiä.

1.6.2.5 *Tarkkailujakso*

Tarkkailujakson minimipituus on 14 päivää. Jakson pituus ei ole ehdottoman kiinteä, vaan sitä voidaan tarvittaessa säätää myrkytysoireiden, oireiden alkamisnopeuden ja toipumisjakson mukaan. Myrkytysoireiden ilmestymis- ja häviämisajankohta sekä kuoleman ajankohta ovat tärkeät, etenkin jos kuolemilla on taipumus ”viivästyä”.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Eläimiä pidetään yksin häkeissä. Testattavaa ainetta levitetään tasaisesti alueelle, joka on noin 10 % kehon kokonaispinta-alasta. Erittäin myrkyllisten aineiden kohdalla voidaan käyttää pienempää pinta-alaa, mutta ainetta on levitettävä mahdollisimman ohuelti ja tasaisesti niin suurelle alueelle kuin mahdollista.

Testattava ihoalue peitetään harsositeellä ja ärsyttämättömällä laastarilla koko 24 tunnin altistusjakson ajaksi. Tämän lisäksi alue on peitettävä siten, että harsoside ja aine pysyvät paikallaan eikä eläin pääse syömään ainetta. Eläin voidaan sitoa osittain siten, että se ei pysty syömään ainetta. Täyttä liikkumattomuutta ei kuitenkaan suositella.

▼B

Altistusjakson jälkeen aineen jäännökset poistetaan vedellä tai muulla sopivalla ihonpuhdistusmenetelmällä.

Havainnot tehdään ja kirjataan systemaattisesti. Jokaisesta eläimestä tulee olla oma kirjanpitonsa. Ensimmäisen päivän aikana havaintoja on tehtävä usein. Vähintään kerran työpäivässä on tehtävä huolellinen kliininen tutkimus. Muut havainnot tehdään päivittäin ja eläinhukka minimoidaan soveltuvin toimenpitein (kuolleet eläimet jäädytetään tai niille tehdään ruumiinavaus ja heikot tai kuolevat eläimet eristetään tai lopetetaan).

Tarkkaillaan turkin, käsitellyn ihon, silmien, limakalvojen, hengitysteiden, verenkierron, autonomisen hermoston, keskushermoston, somatomotorisen aktiviteetin ja käyttäytymismallin muutoksia. Erityisesti on tarkkailtava vapinaa, kouristuksia, syljeneritystä, ripulia, letargiaa, unta ja koomaa. Kuoleman ajankohta on kirjattava niin tarkoin kuin mahdollista. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu. Kaikki huomattavan suuret patologiset muutokset on kirjattava. Histopatologista tutkimusta varten otetaan kudosnäytteet voimassa olevan ohjeen mukaan.

Arviointi myrkyllisyydestä toisen sukupuolen kohdalla

Kun toiselle sukupuolelle tehty koe on saatu päätökseen, ainetta annostellaan vähintään viiden toista sukupuolta olevan eläimen ryhmälle, jotta voitaisiin todeta, ovatko tämän sukupuolen eläimet aineelle huomattavasti herkempiä. Pienemmänkin eläinmäärän käyttöä voidaan perustella yksittäisissä tapauksissa. Jos on käytettävissä tietoja, joiden mukaan testatun sukupuolen eläimet ovat huomattavasti herkempiä, toista sukupuolta ei tarvitse testata.

2. TIEDOT

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, jossa jokaisen ryhmän kohdalla on eläinten määrä kokeen alussa, yksittäisten eläinten kuolinajankohdat, niiden eläinten määrä, joilla on muita myrkyllisyydestä johtuvia oireita, myrkytysoireiden kuvaus ja ruumiinavauslöydökset. Yksittäisten eläinten painot on kirjattava välittömästi ennen aineen annostelua, sen jälkeen viikoittain ja lopuksi kuoleman jälkeen. Painonmuutokset on laskettava ja kirjattava, kun eläin pysyy hengissä kauemmin kuin yhden vuorokauden. Eläimet, jotka on lopetettu aineen aiheuttaman ahdistuksen ja kipujen takia, luokitellaan aineen vaikutuksesta kuolleiksi. LD_{50} voidaan määrittää yleisesti tunnetun menetelmän mukaan.

Tietojen arviointiin tulee sisältyä mahdolliset yhteydet eläimen aineelle altistamisen ja kaikkien poikkeavuuksien esiintymisen ja vakavuuden välillä. Tällaisia poikkeavuuksia ovat esimerkiksi käyttäytymismuutokset, kliiniset muutokset, painonmuutokset, kuolleisuus ja muut toksikologiset vaikutukset.

3. RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

▼B

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio jne.,

— testiolosuhteet (mukaan lukien ihonpuhdistusmenetelmä ja siteen tyyppi: okklusiivinen tai ei-okklusiivinen),

— annostasot (annoksen suuruus apuaine mukaan lukien sekä mahdollinen testattavan aineen pitoisuus),

— altistettujen eläinten sukupuoli,

— vastetietojen luokittelu sukupuolen ja annostason mukaan (kokeen aikana kuolleiden tai lopetettujen eläinten määrä, niiden eläinten määrä, joilla on myrkyllisyydestä johtuvia oireita, altistettujen eläinten määrä),

— annostelun jälkeisten kuolemien ajankohta, syyt ja kriteerit eläinten lopettamiseen,

— kaikki havainnot,

— LD_{50}-arvo sukupuolelle, jolle on tehty 14 päivän pituinen kattava koe (määritysmenetelmä on ilmoitettava),

— LD_{50}-arvon 95 prosentin luottamusväli (mahdollisuuksien mukaan),

— annos-kuolleisuuskäyrä ja sen kaltevuus (määritysmenetelmän sallimissa rajoissa),

— ruumiinavauslöydökset,

— muut histopatologiset löydökset,

— toisen sukupuolen testauksen tulokset (jos on tehty),

— tulosten pohdinta (erityistä huomiota on kiinnitettävä kokeen aikana tehtyjen koe-eläinten lopettamisien LD_{50}-arvoon kohdistamaan vaikutukseen),

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4. **VIITTEET**

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

▼B

B.4. **AKUUTTI TOKSISUUS: IHOÄRSYTTÄVYYS/SYÖVYTTÄVYYS**

1. **TESTIMENETELMÄ**

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 404 (2002).

1.1 JOHDANTO

Tämän päivitetyn testimenetelmän valmistelun yhteydessä on erityisesti pyritty ottamaan huomioon eläinten hyvinvointiin liittyvät näkökohdat sekä kaikkien testiaineesta aiemmin saatujen tietojen arviointi, jotta voidaan välttää tarpeettomia eläinkokeita. Tässä menetelmässä esitetään suositus, että ennen tässä kuvatun, aineen ärsyttävyyttä/syövyttävyyttä tutkivan *in vivo* -testin toteuttamista on arvioitava aiempien relevanttien tutkimustulosten painoarvo. Jos saatavissa olevat tiedot ovat puutteellisia, niitä voidaan täydentää vaiheittaisen menettelyn avulla (1). Suositeltava testausstrategia, joka on selostettu tämän menetelmän liitteessä, sisältää validoitujen ja hyväksyttyjen *in vitro* -testien suorittamisen. Lisäksi suositellaan tilanteen mukaan, että *in vivo* -alkutestissä eläimelle asetetaan kolme testilappua peräkkäin eikä samanaikaisesti.

Sekä järkevien tieteellisten menettelytapojen että eläinten hyvinvoinnin vuoksi *in viro* -testiä ei pidä suorittaa ennen kuin kaikkien saatavissa olevien testiaineen mahdolliseen ihoärsyttävyyteen/-syövyttävyyteen liittyvien tietojen painoarvo on arvioitu. Tällaisia tietoja ovat todisteet aiemmista ihmisille ja/tai koe-eläimille tehdyistä tutkimuksista, todisteet yhden tai usean rakenteellisesti samankaltaisen aineen tai ainetta sisältävän seoksen ärsyttävyydestä/syövyttävyydestä, aineen voimakasta happamuutta tai emäksisyyttä osoittavat tulokset (2) (3) sekä validoidut ja hyväksytyt *in vitro*- tai *ex vivo* -testit (4) (5) (5a). Tällainen analyysi vähentää *in vivo* -testien tarvetta sellaisten aineiden kohdalla, joiden ihoärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä aiempi tutkimus on jo tuottanut riittävästi todisteita.

Suositeltava tapa toteuttaa vaiheittainen menettely, johon sisältyy validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro*- tai *ex vivo* -testejä ärsyttävyyden/syövyttävyyden selvittämiseksi, selostetaan tämän menetelmän liitteessä. Tämä menettelytapa kehitettiin OECD:n seminaarissa (6), jonka osanottajat suosittelevat sitä yksimielisesti, ja se hyväksyttiin suositeltavaksi testimenettelyksi Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances (GHS) -kokouksessa (7). Vaikka tämä menettely ei olekaan olennainen osa testimenetelmää B.4, sen käyttöä suositellaan ennen *in vivo* -testin suorittamista. Uusia aineita testattaessa se on suositeltava vaiheittainen menettelytapa tieteellisesti pätevien tulosten tuottamiseksi aineen ärsyttävyydestä/syövyttävyydestä. Sellaisten aineiden kohdalla, joiden ihoärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä ei ole riittävästi tietoja, menettelytapaa voidaan käyttää puuttuvien tietojen hankkimiseen. Jos päätetään käyttää jotain muuta menettelytapaa tai olla käyttämättä vaiheittaista menettelytapaa, päätös on perusteltava.

Jos aineen ärsyttävyyttä tai syövyttävyyttä ei voida määrittää vaiheittaisen menettelyn mukaisesti aiempien tulosten painoarvoanalyysin avulla, on syytä harkita *in vivo* -testiä (katso liite).

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ihoärsytys: korjautuvan ihovaurion syntyminen enintään neljä tuntia kestäneen testiaineen annostelun jälkeen.

Ihon syöpyminen: korjautumattoman ihovaurion eli näkyvän orvasketeen ja verinahkaan ulottuvan kuolion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen aineen annostelun jälkeen. Tyypillisiä syöpymisreaktioita ovat haavaumat, verenvuoto, veriset ruvet, 14 päivän tarkkailujakson lopussa ihon vaalenemisen aiheuttama värinmuutos, kokonaan kaljuuntuneet alueet ja arvet. Epäselvien vaurioiden tapauksessa olisi harkittava histopatologista tutkimusta.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiaine annostellaan yhtenä annoksena koe-eläimen iholle; eläimen ihon käsittelemättömät alueet toimivat kontrollina. Ärsytyksen/-syöpymisen aste todetaan ja pisteytetään määrävälein, ja vauriota kuvaillaan vaikutusten arvioinnin täydentämiseksi. Testin on kestettävä niin pitkään, että havaittujen vaikutusten korjautuvuus tai korjautumattomuus voidaan arvioida.

Eläimet, joissa havaitaan merkkejä jatkuvasta vakavasta stressistä ja/tai tuskista missä tahansa testin vaiheessa, on lopetettava inhimillisellä tavalla, ja tämä on otettava huomioon testiaineen arvioinnissa. Kuolevien ja kärsivien eläinten lopettamiskriteerit ovat lähteessä (8).

1.4 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 ***In vivo* -testin valmistelu**

1.4.1.1 *Eläinlajin valinta*

Suositeltava koe-eläinlaji on albiinokaniini. Kokeessa käytetään nuoria ja terveitä täysikasvuisia yksilöitä. Muiden lajien käyttö on perusteltava.

1.4.1.2 *Eläinten valmistelu*

Noin 24 tuntia ennen testiä eläinten selkäpuolen karva ajetaan lyhyeksi. Ihoa on varottava hankaamasta. Testissä voidaan käyttää vain eläimiä, joiden iho on terve ja vahingoittumaton.

Joillakin kaniinikannoilla esiintyy tiheitä karvalaikkuja, jotka ovat tavallista voimakkaampia tiettyinä vuodenaikoina. Tällaisia tiheäkarvaisia alueita ei pidä käyttää testikohtina.

1.4.1.3 *Eläinten häkit ja ruokinta*

Jokaisella eläimellä on oltava oma häkki. Koe-eläinhuoneen lämpötilan on oltava kaniineilla 20 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 % eikä mielellään ylitä 70 %:a muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa täytyy käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

▼B

1.4.2 **Testin suoritus**

1.4.2.1 *Testiaineen annostelu*

Testiaine annostellaan pienelle ihoalueelle (noin 6 cm^2) ja peitetään sideharsolapulla, joka kiinnitetään ihoa ärsyttämättömällä teipillä. Jos suora annostelu ei ole mahdollinen (esimerkiksi nesteiden tai joidenkin tahnojen tapauksessa), testiaine annostellaan ensin sideharsolapulle, joka sitten asetetaan iholle. Lappu on pidettävä kevyessä kosketuksessa ihoon sopivan, puolitiiviin siteen avulla koko altistusjakson ajan. Jos testiaine annostellaan lappuun, se on kiinnitettävä ihoon siten, että aine on hyvässä kosketuksessa ihoon ja leviää tasaisesti. Eläimen yltäminen lappuun ja testiaineen nieleminen tai sisäänhengittäminen on estettävä.

Nestemäisiä testiaineita käytetään yleensä laimentamattomina. Testattaessa kiinteitä aineita (jotka voidaan tarvittaessa jauhaa) testiaine on kostutettava mahdollisimman pienellä määrällä vettä (tai tarvittaessa jollain muulla sopivalla kantaja-aineella), jotta saadaan hyvä ihokosketus. Jos käytetään muuta kantaja-ainetta kuin vettä, kantaja-aineen mahdollisen vaikutuksen testiaineen aiheuttamaan ihoärsytykseen pitäisi olla olematon tai mahdollisimman vähäinen.

Tavallisesti neljän tunnin mittaisen altistusjakson lopussa ylimääräinen testiaine on poistettava, jos se on käytännössä mahdollista, vedellä tai sopivalla liuottimella muuttamatta orvaskeden senhetkistä vastetta tai eheyttä.

1.4.2.2 *Annostaso*

Testikohtaan annostellaan 0,5 ml nestettä tai 0,5 g kiinteää ainetta tai tahnaa.

1.4.2.3 *Alkutesti (ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden in vivo -testi yhdelle eläimelle)*

On erittäin suositeltavaa suorittaa *in vivo* -testi aluksi yhdelle eläimelle, erityisesti jos testiaineella arvellaan mahdollisesti olevan syövyttävä vaikutus. Tämä on vaiheittaisen menettelyn mukaista (katso liite 1).

Kun aine on todettu syövyttäväksi aiempien tietojen painoarvoanalyysin perusteella, eläinkokeita ei enää tarvita. Useimmille syövyttäviksi epäillyille aineille *in vivo* -jatkotesti ei yleensä ole tarpeen. Tapauksissa, joissa lisätietoja katsotaan tarvittavan puutteellisten todisteiden takia, rajoitettuja eläinkokeita voidaan kuitenkin tehdä seuraavasti: Enintään kolme testilappua asetetaan yksi toisensa jälkeen eläimen iholle. Ensimmäinen niistä poistetaan kolmen minuutin kuluttua. Jos vakavaa ihoreaktiota ei havaita, toinen lappu asetetaan iholle ja poistetaan tunnin kuluttua. Jos havainnot tässä vaiheessa osoittavat, että altistusta voidaan inhimillisesti jatkaa neljään tuntiin asti, kolmas lappu asetetaan paikoilleen ja poistetaan neljän tunnin kuluttua. Vaste pisteytetään.

Jos syövyttävä vaikutus havaitaan minkä tahansa kolmen peräkkäisen altistuksen aikana, testi lopetetaan heti. Jos syövyttävää vaikutusta ei havaita viimeisen lapun poistamisen jälkeen, eläintä tarkkaillaan 14 päivän ajan, mikäli syöpymistä ei kehity sitä ennen.

▼B

Jos testiaineen ei odoteta aiheuttavan syöpymistä vaan ärsytystä, eläimelle asetetaan yksi lappu neljän tunnin ajaksi.

1.4.2.4 *Vahvistustesti (ihoärsyttävyyden in vivo -testi useille eläimille)*

Jos alkutestissä ei havaita syövyttävää vaikutusta, ärsyttävyys tai negatiivinen vaste on vahvistettava testaamalla vielä kaksi eläintä. Kummallekin asetetaan lappu neljän tunnin altistusjakson ajaksi. Jos ärsyttävä vaikutus havaitaan alkutestissä, vahvistustesti voidaan tehdä peräkkäistestinä tai altistamalla kaksi lisäeläintä yhtäaikaisesti. Siinä poikkeustapauksessa, että alkutestiä ei tehdä, kahdelle tai kolmelle eläimelle voidaan asettaa yksi lappu, joka poistetaan neljän tunnin kuluttua. Kun käytetään kahta eläintä, lisätestiä ei tarvita, jos molemmilla esiintyy sama vaste. Muussa tapauksessa testataan myös kolmas eläin. Epäselvät vasteet täytyy mahdollisesti arvioida testaamalla lisää eläimiä.

1.4.2.5 *Tarkkailujakso*

Tarkkailujakson on oltava riittävän pitkä havaittujen vaikutusten korjautuvuuden arvioimiseksi täydellisesti. Testi on kuitenkin lopetettava heti, jos eläin osoittaa jatkuvia kovien tuskien tai stressin merkkejä. Vaikutusten korjautuvuuden määrittämiseksi eläimiä on tarkkailtava enintään 14 päivän ajan lappujen poistamisen jälkeen. Jos korjautuvuus todetaan ennen kuin 14 päivää on kulunut, testi on lopetettava silloin.

1.4.2.6 *Kliiniset havainnot ja ihoreaktioiden pisteytys*

Kaikista eläimistä tutkitaan eryteeman ja ödeeman merkit ja vasteet pisteytetään ensiksi 60 minuutin jälkeen ja sitten 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua lapun poistamisesta. Yhdelle eläimelle tehtävän alkutestin jälkeen testikohta tutkitaan myös heti lapun poistamisen jälkeen. Ihoreaktiot pisteytetään ja kirjataan jäljempänä esitetyn taulukon asteikon mukaan. Jos iholla esiintyy vaurioita, joita ei voida tunnistaa ärsytykseksi tai syöpymiseksi 72 tunnin kuluttua, voi olla tarpeen jatkaa havainnointia päivään 14 asti, jotta vaikutusten korjautuvuus voidaan todeta. Ärsytyksen lisäksi kaikki paikalliset toksiset vaikutukset, kuten ihon rasvan liukeneminen ja mitkä tahansa koko elimistöön kohdistuvat vaikutukset (esimerkiksi vaikutukset kliinisiin toksisuuden merkkeihin ja ruumiinpainoon), on kuvattava ja kirjattava täydellisesti. Epäselvien vaurioiden tapauksessa olisi harkittava histopatologista tutkimusta.

Ihovasteiden pisteytys on väistämättä subjektiivista. Ihovasteiden pisteytyksen yhdenmukaistamiseksi sekä testilaboratorion ja havaintoja tekevien ja tulkitsevien henkilöiden työn helpottamiseksi havaintoja tekevän henkilöstön on oltava riittävän perehtynyttä pisteytysjärjestelmään (katso jäljempänä olevaa taulukkoa). Kuvitettu opas ihoärsytyksen ja muiden vaurioiden asteista voi olla hyödyllinen (9). Ihovasteiden pisteytys on arvioitava sokkona.

2. MÄÄRITYSTULOKSET

2.1 TULOSTEN ESITYSTAPA

Tutkimuksen tulokset on esitettävä taulukkomuodossa lopullisessa testiselosteessa, ja niiden on sisällettävä kaikki kohdassa 3.1 luetellut asiat.

▼B

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI

Ihoärsytyspisteet on arvioitava yhdessä vaurioiden luonteen ja vakavuuden sekä niiden korjautuvuuden tai korjautumattomuuden kanssa. Yksittäiset pisteet eivät edusta aineen ärsyttävyysominaisuuksien absoluuttista tasoa, koska testiaineen muutkin vaikutukset ovat arvioinnissa mukana. Sen sijaan yksittäisiä pisteitä voidaan tarkastella viitearvoina, jotka on arvioitava kaikkien muiden tutkimuksessa tehtyjen havaintojen yhteydessä.

Ihovaurioiden korjautuvuus on otettava huomioon ärsytysvastetta arvioitaessa. Jos vasteet kuten kaljuuntuminen (suppealla alueella), liikasarveistuminen, liikakasvu ja hilseily jatkuvat 14 päivän tarkkailujakson loppuun asti, testiainetta voidaan pitää ihoa ärsyttävänä.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 LOPPURAPORTTI

Loppuraportissa on oltava seuraavat tiedot:

Perustelut *in vivo* -testin tekemiselle: aiemmista tutkimuksista saatujen testitulosten painoarvoanalyysi, mukaan luettuina vaiheittaisen menettelyn tulokset:

— aiemmista testeistä saatujen relevanttien tulosten kuvaus,

— testissä käytetyn menettelytavan kustakin vaiheesta saadut tulokset,

— kuvaus tehdyistä *in vitro* -testeistä, mukaan luettuina suoritusta koskevat yksityiskohtaiset tiedot ja testi-/vertailuaineesta saadut tulokset,

— painoarvoanalyysi *in vivo* -testiä varten.

Testiaine:

— tunnistetiedot (esimerkiksi CAS-numero, alkuperä, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, eränumero)

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet (esimerkiksi pH, haihtuvuus, liukoisuus, stabiilius),

— jos kyseessä on seos, sen koostumus ja ainesosien suhteellinen osuus.

Kantaja-aine:

— tunnistetiedot, konsentraatio (tilanteen mukaan), käytetty tilavuus,

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläin:

— käytetty laji ja kanta, perustelut muiden eläinten kuin albiinokaniinien käytölle,

— uros- ja naaraseläinten määrä,

— eläinyksilöiden paino testin alussa ja lopussa,

— eläinten ikä testin alussa,

— eläinten alkuperä, häkkijärjestelyt, ruokavalio ja niin edelleen.

▼B

Testiolosuhteet:

— lapun asetuskohdan valmistelu,

— tiedot lapun materiaalista ja asetustekniikasta,

— tiedot testiaineen valmistelusta, annostelusta ja iholta poistamisesta.

Tulokset:

— kunkin eläimen ärsytys-/syöpymisvasteen pisteytys jokaiselta mittauskerralta taulukkomuodossa,

— havaittujen vaurioiden kuvaus,

— sanallinen kuvaus havaitun ärsytyksen/syöpymisen luonteesta ja asteesta sekä mahdolliset histopatologiset löydökset,

— kuvaus muista paikallisista haittavaikutuksista (esimerkiksi ihon rasvan liukeneminen) ja ihoärsytyksen/-syöpymisen lisäksi koko elimistöön kohdistuvat vaikutukset,

tulosten pohdinta.

4. **LÄHDELUETTELO**

(1) Barratt, M. D., Castell, J. V., Chamberlain, M., Combes, R. D., Dearden, J. C, Fentem, J. H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T. J. B., Livingston, D. J., Provan, W. M., Rutten, F. A. J. J. L., Verhaar, H. J. M., Zbinden, P. (1995). The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.

(2) Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P., Worth W. M. H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. I*n Vitro,* 2, 19–26.

(3) Worth, A. P., Fentem, J. H., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Liebsch, M. (1998). Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709–720.

(4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, ”Skin Irritation”, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Bryssel.

(5) Fentem, J.H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, 483–524.

(5a) Testimenetelmä B.40 Skin Corrosion.

(6) OECD (1996). OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Pidetty Solnassa, Ruotsissa 22.–.24. tammikuuta 1996 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(7) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, marraskuu 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, *(20T-2004)*. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, elokuu 1990.

(Saatavana OECD:n sihteeristöltä pyydettäessä.)

▼B

Taulukko I

IHOREAKTIOIDEN PISTEYTYS

Eryteeman ja karstan muodostus

Ei eryteemaa	0
Hyvin lievä eryteema (tuskin havaittava)	1
Selkeästi erottuva eryteema	2
Keskivakava — vakava eryteema	3
Vakava eryteema (voimakas punoitus) — karsta, joka estää eryteeman pisteytyksen	4

Suurin mahdollinen pistemäärä: 4

Ödeeman (turvotuksen) muodostus

Ei ödeemaa	0
Hyvin lievä ödeema (tuskin havaittava)	1
Lievä ödeema (selvärajainen alue, jonka reunat ovat koholla)	2
Keskivakava ödeema (noin 1 mm koholla)	3
Vakava ödeema (enemmän kuin 1 mm koholla ja levinnyt altistuskohtaa laajemmalle)	4

Suurin mahdollinen pistemäärä: 4

Epäselvien vaurioiden tapauksessa voidaan tehdä histopatologinen tutkimus.

▼B

LIITE

Ihoärsyttävyyden ja -syövyttävyyden vaiheittainen testaus

YLEISIÄ NÄKÖKOHTIA

Sekä järkevien tieteellisten menettelytapojen että eläinten hyvinvoinnin vuoksi on tärkeää välttää tarpeettomia eläinkokeita ja tehdä mahdollisimman vähän sellaisia testejä, jotka todennäköisesti aiheuttavat eläimissä vakavia vasteita. Ennen *in vivo* -testin suunnittelemista on arvioitava kaikki tiedot testiaineen mahdollisesta ihoärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä. Riittävät todisteet testiaineen ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden luokittelemiseksi voivat jo olla olemassa, jolloin koe-eläintestejä ei tarvita. Painoarvoanalyysin ja vaiheittaisen menettelyn käyttö vähentää *in vivo* -testien tarvetta, erityisesti jos on todennäköistä, että testiaine aiheuttaa vakavia reaktioita.

On suositeltavaa arvioida aineiden ihoärsyttävyydestä ja -syövyttävyydestä saatavissa olevien tietojen painoarvo, jotta voidaan päättää, tarvitaanko aineen ihoärsytyspotentiaalin määrittämiseksi muita testejä kuin *in vivo* -ihotesti. Jos muita testejä tarvitaan, on suositeltavaa käyttää vaiheittaista menettelyä relevanttien koetulosten hankkimiseksi. Jos ainetta ei ole aikaisemmin testattu, vaiheittaisen menettelyn avulla voidaan hankkia ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden arviointiin tarvittavat tulokset. Tässä liitteessä kuvattu testimenettely on kehitetty OECD:n seminaarissa (1), ja se on vahvistettu ja laajennettu myöhemmin järjestelmässä *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances,* sellaisena kuin se vahvistettiin kemikaalikomitean ja kemikaalityöryhmän 28. yhteisessä kokouksessa marraskuussa 1998 (2).

Vaikka tämä vaiheittainen testausstrategia ei ole olennainen osa testimenetelmää B.4, siinä kuvataan suositeltavaa lähestymistapaa aineen ihoärsyttävyys-/--syövyttävyysominaisuuksien määrittämiseen. Tämä lähestymistapa edustaa sekä parhaita käytäntöjä että eettistä vertailukohdetta ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden *in vivo* -testauksessa. Siinä annetaan ohjeita *in vivo* -testin suorittamiseen ja esitetään yhteenveto tekijöistä, jotka on käsiteltävä ennen testin aloittamista. Strategia tarjoaa lähestymistavan aiemmin saatujen tulosten arviointiin testiaineen ihoärsyttävyys-/-syövyttävyysominaisuuksien selvittämiseksi, ja sen avulla voidaan vaihe vaiheelta tuottaa merkitseviä tuloksia aineista, joista tarvitaan lisätietoja tai joita ei ole aikaisemmin tutkittu. Strategiassa suositellaan myös tietyissä tapauksissa käyttämään validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro*-tai *ex vivo* -testejä ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden toteamiseksi.

ARVIOINTI- JA TESTAUSSTRATEGIAN KUVAUS

Ennen vaiheittaiseen menettelyyn sisältyvien testien suorittamista (kaavio) on analysoitava kaikki saatavissa olevat tiedot, jotta *in vivo* -ihotestauksen tarve voidaan määrittää. Vaikka yksittäisistä parametreista (esimerkiksi äärimmäiset pH-arvot) voidaan saada merkitseviä tietoja, on syytä ottaa huomioon tulokset kokonaisuudessaan. Kaikkien kyseessä olevan aineen tai sen kaltaisten aineiden vaikutusta koskevien tietojen painoarvo on arvioitava testauspäätöksen yhteydessä, ja päätökselle on esitettävä perustelut. Ensisijaisesti on painotettava sekä ihmisillä että eläimillä aiemmin saatuja tuloksia ja seuraavaksi *in vitro*- tai *ex vivo* -testien tuloksia. Syövyttävien aineiden in *vivo* -testejä on vältettävä aina kun se on mahdollista. Testimenettelyssä on otettava huomioon seuraavat asiat:

▼B

Ihmisillä ja eläimillä aiemmin saatujen tulosten arviointi (vaihe 1). Aiemmat ihmisillä saadut tulokset, esimerkiksi kliiniset tai työperäiseen altistukseen liittyvät tutkimustulokset ja tapausselostukset ja/tai eläinkokeiden tulokset, esimerkiksi yksittäisten tai toistettujen ihoaltistustestien tulokset, on otettava ensiksi huomioon, koska niistä saadaan suoraan aineen ihovaikutuksiin liittyviä tietoja. *In vivo* -testejä ei tarvitse tehdä aineille, joiden ärsyttävyys tai syövyttävyys tiedetään, eikä aineille, joista on selvästi todistettu, että ne eivät ole ärsyttäviä tai syövyttäviä.

Rakenne—aktiivisuusanalyysi (SAR) (vaihe 2). Jos saatavilla on rakenteellisesti samankaltaisten aineiden testituloksia, ne on otettava huomioon. Kun rakenteellisesti samankaltaisista aineista tai niitä sisältävistä seoksista on saatavilla riittävästi ihmisillä tehtyjen testien ja eläinkokeiden tuloksia, jotka osoittavat niiden ihoärsyttävyys-/-syövyttävyyspotentiaalin, voidaan olettaa, että arvioitava testiaine tuottaa samanlaiset vasteet. Tällaisessa tapauksessa ainetta ei kenties tarvitse testata. Negatiiviset tulokset rakenteellisesti samankaltaisten aineiden tai sellaisista aineista koostuvien seosten tutkimuksista eivät vaiheittaisessa menettelyssä ole riittävä todiste siitä, että aine ei ole ihoa ärsyttävä tai syövyttävä. Ihoärsyttävyys ja -syövyttävyys on selvitettävä validoitujen ja hyväksyttyjen SAR-menetelmien avulla.

Fysikokemialliset ominaisuudet ja kemiallinen reaktiivisuus (vaihe 3). Aineella, jolla esiintyy äärimmäisiä pH-arvoja, kuten ≤ 2,0 ja ≥ 11,5, voi olla voimakkaita paikallisvaikutuksia. Jos aine määritetään ihoa syövyttäväksi äärimmäisen pH-arvon perusteella, sen happo-/emäsreservi (eli puskurointikyky) voidaan myös ottaa huomioon (3) (4). Jos puskurointikyky viittaa siihen, että aine ei ole ihoa syövyttävä, tämän vahvistamiseksi on tehtävä jatkotesti, jonka on ensisijaisesti oltava validoitu ja hyväksytty *in vitro*- tai *ex vivo* -testi (katso vaiheet 5 ja 6).

Toksisuus iholla (vaihe 4). Jos aine on todettu erittäin toksiseksi ihon kautta annosteltuna, ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden testaaminen *in vivo* -testillä ei kenties ole järkevää, koska tavallisesti käytetty testiainemäärä voi ylittää erittäin toksisen annoksen ja siten johtaa eläinten kuolemaan tai vakaviin kärsimyksiin. Jos lisäksi toksisuuden ihotestejä albiinokaniineilla on jo tehty raja-annosarvoon 2 000 mg/ruumiinpainokilo tai sitä suurempaan arvoon eikä ihoärsytystä tai -syöpymistä ole havaittu, ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden lisätestaus ei kenties ole tarpeen. Joitakin seikkoja on syytä pitää mielessä arvioitaessa aiempien tutkimusten tuloksia akuutista toksisuudesta iholla. Esimerkiksi ihovaurioista raportoidut tiedot voivat olla puutteellisia. Testeissä ja havainnoinnissa on saatettu käyttää muuta eläinlajia kuin kaniinia, ja eri eläinlajien vasteherkkyys poikkeaa toisistaan suuresti. Niin ikään eläimille annosteltu testiaine ei välttämättä ole ollut sopivassa muodossa ihoärsyttävyyden/-syöpymisen arvioimiseksi (esimerkiksi aineiden laimentaminen toksisuuden testaamiseksi iholla (5)). Tapauksissa, joissa hyvin suunnitellut ja toteutetut ihotoksisuutta tutkivat testit on tehty kaniineille, negatiiviset löydökset voidaan kuitenkin katsoa riittäviksi todisteiksi siitä, että aine ei ole syövyttävä eikä ärsyttävä.

In vitro- tai ex vivo -testien tulokset (vaiheet 5 ja 6). Aineita, joilla on todettu olevan syövyttäviä tai vakavasti ärsyttäviä ominaisuuksia validoiduissa ja hyväksytyissä, nimenomaan näiden ominaisuuksien mittaamista varten kehitetyissä *in vitro*- tai *ex vivo* -testeissä (6) (7), ei tarvitse testata eläimillä. Voidaan olettaa, että tällaiset aineet aiheuttavat samoja vaikutuksia *in vivo* -testeissä.

▼B

In vivo -testi kaniineilla (vaiheet 7 ja 8). Jos painoarvoanalyysin jälkeen päätetään toteuttaa *in vivo* -testi, se on aloitettava testaamalla ensin yksi eläin. Jos tämän testin tulokset osoittavat, että aine on ihoa syövyttävä, jatkotestiä ei pidä tehdä. Jos alkutestissä ei todeta syövyttävää vaikutusta, ärsyttävyys tai negatiivinen vaste on vahvistettava testaamalla vielä enintään kaksi eläintä neljän tunnin altistusjakson ajan. Jos alkutestissä todetaan ihoa ärsyttävä vaikutus, vahvistustesti voidaan toteuttaa peräkkäistestinä tai altistamalla mainitut kaksi eläintä samanaikaisesti.

LÄHDELUETTELO

1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Pidetty Solnassa, Ruotsissa, 22.–24. tammikuuta 1996 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, marraskuu 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3) Worth, A. P., Fentem J. H., Balls M., Botham P. A., Curren R. D., Earl L. K., Esdaile D. J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, 709–720.

4) Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P., Worth, W. M. H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, 2 (1) s. 1926.

5) Patil, S. M., Patrick, E., Maibach, H. I. (1996). Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation teoksessa Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (toim.): Dermatotoxicology. Viides painos. ISBN 1-56032-356-6, luku 31, 411–436.

6) Testimenetelmä B.40.

7) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483–524.

▼B

Kaavio

IHOÄRSYTTÄVYYDEN/SYÖVYTTÄVYYDEN TESTAUS- JA ARVIOINTIMENETTELY

	Toimi	Löydös	Johtopäätös
1	Toimi Aiemmat tulokset ihmisistä tai eläimistä osoittavat iho- tai limakalvoreaktioita	Syövyttävä	Apikaalinen päätepiste; katsotaan syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
		Ärsyttävä	Apikaalinen päätepiste; katsotaan ärsyttäväksi. Testiä ei tarvita.
		Ei syövyttävä eikä ärsyttävä	Apikaalinen päätepiste; ei katsota syövyttäväksi tai ärsyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓ *Tietoja ei saatavilla tai saatavilla olevat tiedot eivät mahdollista lopullista johtopäätöstä* ↓		
2	Toteuta ihosyövyttävyyden/-ärsyttävyyden SAR-arviointi	Ennustaa vakavia ihovaurioita	Katsotaan syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
		Ennustaa ihoärsytystä	Katsotaan ärsyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓ *Ennusteita ei voida tehdä tai ennusteet ovat negatiivisia tai eivät mahdollista lopullista johtopäätöstä* ↓		
3	Mittaa pH (ota huomioon puskurointikyky tarpeen mukaan)	pH ≤ 2 tai ≥ 11,5 (suuri puskurointikyky, jos merkityksellistä)	Oletetaan syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓ *2 < pH < 11,5, tai pH ≤ 2.0 tai ≥ 11,5 ja pieni tai olematon puskurointikyky, jos merkityksellistä* ↓		
4	Arvioi ihon kautta koko elimistöön kohdistuva toksisuus (1)	Erittäin toksinen	Jatkotestiä ei tarvita.
		Ei syövyttävä eikä ärsyttävä testattaessa kaniineilla raja-annosarvolla 2 000 mg/painokilo tai suuremmalla	Oletetaan, että aine ei syövyttävä eikä ärsyttävä. Jatkotestiä ei tarvita.
	↓ *Mainittuja tietoja ei ole saatavilla tai ne eivät mahdollista lopullista johtopäätöstä* ↓		
5	Toteuta validoitu ja hyväksytty *in vitro*- tai *ex vivo* -testi ihon syöpymisen toteamiseksi	Syövytysvaste	Oletetaan syövyttäväksi *in vivo*. Jatkotestiä ei tarvita.
	↓ *Aine ei ole syövyttävä* ↓		
6	Toteuta validoitu ja hyväksytty *in vitro*- tai *ex vivo*-testi ihoärsytyksen toteamiseksi	Ärsytysvaste	Oletetaan ärsyttäväksi *in vivo*. Jatkotestiä ei tarvita.
	↓ *Validoituja* in vitro- *tai* ex vivo *-testimenetelmiä ihoärsytyksen toteamiseksi ei ole saatavilla tai aine ei ole ihoa ärsyttävä* ↓		
7	Toteuta *in vivo* -alkutesti yhdelle kaniinille	Vakavia ihovaurioita	Katsotaan syövyttäväksi. Jatkotestiä ei tarvita.
	↓ *Ei vakavia ihovaurioita* ↓		
8	Toteuta vahvistustesti yhdelle tai kahdelle eläimelle	Syövyttävä tai ärsyttävä	Katsotaan syövyttäväksi tai ärsyttäväksi. Jatkotestiä ei tarvita.
		Ei syövyttävä eikä ärsyttävä	Ei katsota syövyttäväksi eikä ärsyttäväksi. Jatkotestiä ei tarvita.

(1) Voidaan tehdä myös ennen vaiheita 2 ja 3.

▼B

B.5. AKUUTTI TOKSISUUS: SILMÄN ÄRSYTTÄVYYS/SYÖVYTTÄVYYS

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 405 (2002).

1.1 JOHDANTO

Tämän päivitetyn testimenetelmän valmistelun yhteydessä on erityisesti pyritty ottamaan huomioon kaikkien testiaineesta aiemmin saatujen tietojen arviointi ja eläinten hyvinvointiin liittyvät näkökohdat, jotta voidaan välttää tarpeettomia eläinkokeita. Tässä menetelmässä esitetään suositus, että ennen tässä kuvatun, akuuttia silmä-ärsyttävyyttä/syövyttävyyttä tutkivan *in vivo* -testin toteuttamista on arvioitava aiempien relevanttien tutkimustulosten painoarvo (1). Jos saatavissa olevat tiedot ovat puutteellisia, niitä voidaan täydentää vaiheittaisen menettelyn avulla (2) (3). Suositeltava testausstrategia, joka on selostettu tämän menetelmän liitteessä, sisältää validoitujen ja hyväksyttyjen *in vitro* -testien suorittamisen. Lisäksi suositellaan, että ennen *in vivo* -silmätestin tekemistä tehdään *in vivo* -ihoärsyttävyys-/-syövyttävyystesti silmäsyövytyksen ennustamiseksi.

Sekä järkevien tieteellisten menettelytapojen että eläinten hyvinvoinnin vuoksi *in vivo* -testiä ei pidä suorittaa ennen kuin kaikkien saatavissa olevien testiaineen mahdolliseen silmä-ärsyttävyyteen/-syövyttävyyteen liittyvien tietojen painoarvo on arvioitu. Tällaisia tietoja ovat todisteet aiemmista ihmisille ja/tai koe-eläimille tehdyistä tutkimuksista, todisteet yhden tai usean rakenteellisesti samankaltaisen aineen tai ainetta sisältävän seoksen ärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä, aineen voimakasta happamuutta tai emäksisyyttä osoittavat tulokset (4) (5) sekä validoidut ja hyväksytyt *in vitro*- tai *ex vivo* -ihoärsyttävyys-/-syövyttävyystestit (6) (6a). Tutkimukset voivat olla painoarvoanalyysia aiemmin tehtyjä tai sen tuloksena syntyneitä.

Joidenkin aineiden kohdalla painoarvoanalyysi voi osoittaa, että *in vivo* -testi on tarpeen aineen mahdollisen silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden selvittämiseksi. Kaikissa sellaisissa tapauksissa on ennen *in vivo* -silmätestin harkitsemista suositeltavaa tehdä ensin *in vivo* -ihotesti ihovaikutusten selvittämiseksi ja arvioida se testimenetelmän B.4 mukaan (7). Painoarvoanalyysi ja vaiheittainen menettely vähentävät tarvetta *in vivo* -testeihin silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden selvittämiseksi aineilla, joiden ominaisuuksista muut tutkimukset ovat jo tuottaneet riittävästi todisteita. Jos aineen silmä-ärsyttävyyttä/-syövyttävyyttä ei voida määrittää vaiheittaisen menettelyn avulla eikä edes *in vivo* -ihotestin jälkeen, *in vivo* -silmätesti voidaan tehdä.

▼B

Suositeltava tapa toteuttaa vaiheittainen menettely, johon sisältyy validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro*- tai *ex vivo* -testejä ärsyttävyyden/syövyttävyyden selvittämiseksi, selostetaan tämän menetelmän liitteessä. Tämä menettelytapa kehitettiin OECD:n seminaarissa (8), jonka osanottajat suosittelevat sitä yksimielisesti, ja hyväksyttiin suositeltavaksi testimenettelyksi Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances (GHS) -kokouksessa (9). Vaikka tämä menettely ei olekaan olennainen osa testimenetelmää B.4, sen käyttöä suositellaan ennen *in vivo* -testin suorittamista. Uusia aineita testattaessa se on suositeltava vaiheittainen menettelytapa, jonka avulla voidaan kehittää tieteellisesti päteviä tuloksia aineen ärsyttävyydestä/syövyttävyydestä. Sellaisten aineiden kohdalla, joiden iho- ja silmä-ärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä ei ole riittävästi tietoja, menettelytapaa voidaan käyttää puuttuvien tietojen hankkimiseen. Jos päätetään käyttää jotain muuta menettelytapaa tai olla käyttämättä vaiheittaista menettelytapaa, päätös on perusteltava.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Silmä-ärsytys: silmän muutokset, jotka syntyvät, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, ja korjautuvat täysin 21 päivän kuluessa annostelusta.

Silmän syöpyminen: silmän kudosvauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiaine annostellaan yhtenä annoksena koe-eläimen toiseen silmään. Käsittelemätön silmä toimii kontrollina. Silmän ärtymisen/syöpymisen aste arvioidaan pisteyttämällä sidekalvon, sarveiskalvon ja värikalvon vammat tietyin väliajoin. Muut silmään kohdistuvat vaikutukset ja koko elimistöön kohdistuvat haittavaikutukset kuvataan myös, jotta vaikutuksia voidaan arvioida kokonaisuudessaan. Testin on kestettävä niin pitkään, että havaittujen vaikutusten korjautuvuus tai korjautumattomuus voidaan arvioida.

Eläimet, joissa havaitaan merkkejä jatkuvasta vakavasta stressistä ja/tai tuskista missä tahansa testin vaiheessa, on lopetettava inhimillisellä tavalla, ja tämä on otettava huomioon testiaineen arvioinnissa. Kuolevien ja kärsivien eläinten lopettamiskriteerit ovat lähteessä (10).

1.4 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 ***In vivo* -testin valmistelu**

1.4.1.1 *Eläinlajin valinta*

Suositeltava koe-eläinlaji on albiinokaniini. Kokeessa käytetään nuoria ja terveitä täysikasvuisia yksilöitä. Muiden lajien käyttö on perusteltava.

1.4.1.2 *Koe-eläinten valmistelu*

Kunkin alustavasti testiin valitun koe-eläimen molemmat silmät tutkitaan testin alkua edeltävän 24 tunnin aikana. Eläimiä, joilla esiintyy silmien ärtyneisyyttä, silmävikoja tai aiempia sarveiskalvon vaurioita, ei voi käyttää testissä.

▼B

1.4.1.3 *Eläinten häkit ja ruokinta*

Jokaisella eläimellä on oltava oma häkki. Koe-eläinhuoneen lämpötilan on oltava kaniineilla 20 ºC (± 3 ºC). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 % eikä mielellään ylitä 70 %:a muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

1.4.2 **Testimenettely**

1.4.2.1 *Testiaineen annostelu*

Eläimen alaluomea vedetään varovasti silmämunasta poispäin ja testiaine annostellaan eläimen toisen silmän sidekalvopussiin. Sen jälkeen luomia pidetään varovasti yhdessä sekunnin ajan, jotta aine ei valuisi ulos silmästä. Toinen silmä, jota ei käsitellä, toimii kontrollina.

1.4.2.2 *Huuhtelu*

Koe-eläinten silmiä ei saa pestä vähintään 24 tuntiin testiaineen annostelun jälkeen, paitsi jos kyseessä on kiinteä aine (katso kohta 1.4.2.3.2) tai välitön ärsyttävä tai syövyttävä vaikutus. Silmät voidaan pestä 24 tunnin kuluttua, jos se katsotaan tarpeelliseksi.

Pesemisen vaikutuksen selvittämiseksi ei suositella kontrolliryhmää, paitsi jos sille on tieteellisiä perusteita. Jos kontrolliryhmä tarvitaan, käytetään kahta kaniinia. Pesuolosuhteet on dokumentoitava tarkasti, esimerkiksi pesuaika, pesuliuoksen koostumus ja lämpötila, pesun kesto, nesteen tilavuus ja virtausnopeus.

1.4.2.3 *Annostaso*

1.4.2.3.1 *Nesteiden testaus*

Testattaessa nesteitä testiannos on 0,1 ml. Ainetta ei saa annostella suoraan suihkepumpusta silmään. Nestesuihke on ensin kerättävä astiaan ennen 0,1 ml:n annostelua silmään.

1.4.2.3.2 *Kiinteiden aineiden testaus*

Testattaessa kiinteitä aineita, tahnoja ja hiukkasmaisia aineita annoksen tilavuuden on oltava 0,1 ml tai painon enintään 100 mg. Testiaine jauhetaan hienoksi pölyksi. Kiinteän aineen tilavuus mitataan, kun aine on ensin kevyesti tiivistetty esimerkiksi naputtamalla mittaastiaa. Jos kiinteä aine ei ole poistunut koe-eläimen silmästä fysiologisten mekanismien seurauksena ensimmäiseen havainnointiaikaan mennessä eli tunnin kuluttua käsittelystä, silmä voidaan huuhdella fysiologisella suolaliuoksella tai tislatulla vedellä.

▼B

1.4.2.3.3 *Aerosolien testaus*

On suositeltavaa kerätä kaikki pumpattavat suihkeet ja aerosolit ennen niiden annostelua silmään. Ainoa poikkeus ovat paineistetuissa aerosolisäiliöissä olevat aineet, joita ei voida kerätä höyrystymisen takia. Sellaisessa tapauksessa silmää pidellään auki ja testiaine annostellaan silmään yhtenä sekunnin kestävänä purskauksena 10 cm:n etäisyydeltä suoraan silmän edestä. Välimatka voi vaihdella suihkesäiliön paineen ja sisällön mukaan. On varottava, ettei suihkesäiliön paine vahingoita silmää. Joissakin tapauksissa voi olla syytä arvioida suihkeen voimakkuuden silmälle mahdollisesti aiheuttamat ”mekaaniset” vauriot.

Aerosoliannoksen suuruus voidaan arvioida simuloimalla testiä seuraavalla tavalla. Testiaine suihkutetaan punnituspaperille suoraan paperin edessä olevasta kaniinin silmän kokoisesta aukosta. Paperin painon lisäyksen avulla arvioidaan silmään suihkutettu määrä. Haihtuvien aineiden tapauksessa annoksen suuruus voidaan arvioida punnitsemalla keräysastia ennen ja jälkeen testiaineen poistamisen.

1.4.2.4 *Alkutesti (in vivo -silmä-ärsyttävyys/syövyttävyystesti yhdelle eläimelle)*

Vaiheittaisen menettelyn mukaan (katso liite 1) on erittäin suositeltavaa suorittaa *in vivo* -testi aluksi vain yhdelle eläimelle.

Jos testitulos osoittaa, että aine on silmää syövyttävä tai vakavasti ärsyttävä kuvattua menettelyä käytettäessä, silmän ärtymistä ei pidä enää testata.

1.4.2.5 *Paikallispuudutusaineet*

Paikallispuudutusainetta voidaan käyttää tapauskohtaisesti. Jos painoarvoanalyysi tai vaiheittainen menettely osoittaa, että aine saattaa aiheuttaa tuskia, tai jos alkutestissä on todettu kipureaktio, paikallispuudutusainetta voidaan antaa ennen testiaineen annostelua. Paikallispuudutusaineen laji, konsentraatio ja annos on valittava huolellisesti, jotta varmistetaan, että erot testiaineen aiheuttamissa reaktioissa eivät johdu puudutusaineesta. Testiaineella käsittelemätön silmä on puudutettava samalla tavoin.

1.4.2.6 *Vahvistustesti (in vivo -silmä-ärsyttävyystesti useille eläimille)*

Jos alkutestissä ei havaita syövyttävää vaikutusta, ärsyttävyys tai negatiivinen vaste on vahvistettava testaamalla vielä enintään kaksi eläintä. Jos alkutestissä todetaan voimakas ärsyttävä vaikutus, joka viittaa mahdolliseen voimakkaaseen (korjautumattomaan) vaikutukseen vahvistustestissä, on suositeltavampaa tehdä vahvistustesti vaiheittaisen menettelyn mukaan yhdelle eläimelle kerrallaan kuin altistaa uudet kaksi eläintä samalla kertaa. Jos toisella eläimellä esiintyy syöpymisoireita tai vakavia ärsytysoireita, testiä ei jatketa. Heikon tai keskinkertaisen ärsyttävän vaikutuksen vahvistamiseksi saattaa olla tarpeen testata useampia eläimiä.

▼B

1.4.2.7 *Tarkkailujakso*

Tarkkailujakson on oltava riittävän pitkä havaittujen vaikutusten voimakkuuden ja korjautuvuuden arvioimiseksi täydellisesti. Testi on kuitenkin lopetettava heti, jos eläin osoittaa jatkuvia kovien tuskien tai stressin merkkejä (9). Vaikutusten korjautuvuuden määrittämiseksi eläimiä on tarkkailtava tavallisesti 21 päivän ajan testiaineen antamisen jälkeen. Jos korjautuvuus todetaan ennen kuin 21 päivää on kulunut, testi on lopetettava silloin.

1.4.2.7.1 *Kliiniset havainnot ja silmäreaktioiden pisteytys*

Silmät tutkitaan 1, 24, 48 ja 72 tuntia testiaineen annostelun jälkeen. Eläintä ei saa pitää testattavana sen jälkeen kun lopulliset tiedot on saatu. Eläimet, jotka osoittavat jatkuvia stressin tai vakavien tuskien merkkejä, on viipymättä lopetettava inhimillisellä tavalla, ja tämä on otettava huomioon testiaineen vaikutusten arvioinnissa. Inhimillisellä tavalla on lopetettava eläimet, joilla esiintyy testiaineen annostelun jälkeen seuraavia silmävammoja: sarveiskalvon puhkeaminen tai huomattava sarveiskalvon haavauma mukaan luettuna pullistuma, verta silmän etukammiossa, asteen 4 sarveiskalvosamentuma, joka jatkuu 48 tuntia, valorefleksin puuttuminen (värikalvon vaste 2), joka jatkuu 72 tuntia, sidekalvon haavauma, sidekalvon tai vilkkukalvon kuolio tai arpeutuminen. Näin menetellään siksi, että kyseiset vauriot ovat yleensä korjautumattomia.

Eläimet, joille ei kehity silmävammoja, voidaan lopettaa aikaisintaan kolme päivää testiaineen annostelun jälkeen. Eläimiä, joilla esiintyy lieviä tai keskinkertaisia vaurioita, on tarkkailtava, kunnes vauriot häviävät, tai 21 päivää, jolloin testi lopetetaan. Havainnot on tehtävä päivinä 7, 14 ja 21, jotta voidaan määrittää vaurioiden tila ja niiden korjautuvuus tai korjautumattomuus.

Silmäreaktioiden (sidekalvon, sarveiskalvon ja värikalvon) asteet on kirjattava joka kerta, kun eläintä tutkitaan (taulukko I). Kaikki muut silmävauriot (esimerkiksi sarveiskalvoverho, värjäytyminen) tai koko elimistöön kohdistuvat haittavaikutukset on myös raportoitava.

Reaktioiden tutkimista helpottaa luuppilasien, lampun, biomikroskoopin tai muiden sopivien laitteiden käyttö. Kun havainnot on kirjattu 24 tunnin jälkeen, silmiä voidaan edelleen tutkia fluoreskeiinin avulla.

Silmävasteiden pisteytys on väistämättä subjektiivista. Silmävasteiden pisteytyksen yhdenmukaistamiseksi sekä testilaboratorion ja havaintoja tekevien ja tulkitsevien henkilöiden työn helpottamiseksi havaintoja tekevän henkilöstön on oltava riittävän perehtynyttä pisteytysjärjestelmään. Silmävasteiden pisteytys on arvioitava sokkona.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET**

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI

Silmä-ärsytyspisteet on arvioitava yhdessä vammojen luonteen ja vakavuuden sekä niiden korjautuvuuden tai korjautumattomuuden kanssa. Yksittäiset pisteet eivät edusta aineen ärsyttävyysominaisuuksien absoluuttista tasoa, koska testiaineen muutkin vaikutukset ovat arvioinnissa mukana. Sen sijaan yksittäisiä pisteitä pitäisi tarkastella viitearvoina, jotka ovat merkitseviä vain, kun kaikki muut havainnot ja niiden arviointi tukevat pisteiden antamaa tietoa.

▼B

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 LOPPURAPORTTI

Loppuraportissa on annettava seuraavat tiedot:

Perustelut *in vivo* -testin tekemiselle: aiemmista tutkimuksista saatujen testitulosten painoarvon analyysi, mukaan luettuna vaiheittaisen menettelyn tulokset:

— aiemmista testeistä saatujen relevanttien tulosten kuvaus,

— testimenettelyn kustakin vaiheesta saadut tulokset,

— kuvaus tehdyistä *in vitro* -testeistä, mukaan luettuna niiden suorittamistapa ja testi-/viiteaineesta saadut tulokset,

— kuvaus tehdyistä *in vivo* -ihoärsyttävyys/-syövyttävyystesteistä sekä niiden tulokset,

— painoarvoanalyysi *in vivo* -testiä varten.

Testiaine:

— tunnistetiedot (esimerkiksi CAS-numero, alkuperä, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, eränumero),

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet (esimerkiksi pH, haihtuvuus, liukoisuus, stabiilius, reaktiivisuus veden kanssa),

— jos kyseessä on seos, sen koostumus ja ainesosien suhteellinen osuus,

— jos on käytetty paikallispuudutusainetta, sen tunnistetiedot, puhtaus, laji, annos ja mahdollinen vuorovaikutus testiaineen kanssa.

Kantaja-aine:

— tunnistetiedot, konsentraatio (tilanteen mukaan), käytetty tilavuus,

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläimet:

— käytetty laji ja kanta, perustelut muiden eläinten kuin albiinokaniinien käytölle,

— eläinten ikä testin alussa,

— uros- ja naaraseläinten määrä testi- ja kontrolliryhmissä (jos tarpeen),

— eläinyksilöiden paino testin alussa ja lopussa,

— eläinten alkuperä, häkkijärjestelyt, ruokavalio ja niin edelleen.

Tulokset:

— kuvaus ärsytyksen pisteytyksessä käytetystä välineestä kullakin havaintokerralla (esimerkiksi lamppu, biomikroskooppi, fluoreskeiini),

▼B

— taulukkomuotoiset tiedot kunkin eläimen ärsytys-/syöpymisvasteesta kullakin havaintokerralla siihen asti, kun eläin on poistettu testistä,

— sanallinen kuvaus havaitun ärsytyksen/syöpymisen luonteesta ja asteesta,

— kuvaus kaikista silmässä havaituista vaurioista (esimerkiksi verisuonittuminen, sarveiskalvoverhon muodostus, umpeen muurautuminen, värjäytyminen),

— kuvaus muualle kuin silmään kohdistuvista vaurioista sekä koko elimistöön kohdistuvista haittavaikutuksista ja mahdolliset histopatologiset löydökset.

Tulosten pohdinta.

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Koe-eläimille tehtyjen silmä-ärsytystestien tulosten ekstrapolointi ihmisiä koskeviksi on vain rajoitetusti pätevää. Monissa tapauksissa albiinokaniini on ihmistä herkempi silmää ärsyttäville tai syövyttäville aineille.

Tulosten tulkinnassa on huolellisesti erotettava sekundäärisestä tulehduksesta johtuva ärsytys.

4. **LÄHDELUETTELO**

(1) Barratt, M. D., Castell, J. V., Chamberlain, M., Combes, R. D., Dearden, J. C, Fentem, J. H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T. J. B., Livingston, D. J., Provan, W. M., Rutten, F. A. J. J. L., Verhaar, H. J. M., Zbinden, P. (1995). The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.

(2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C, Dossou, K. G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K. C, Hill, R. N. (1997). Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159–164.

(3) Worth A. P. and Fentem J. H. (1999). A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161–177.

(4) Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P., Worth W. M. H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19–26.

(5) Neun, D. J. (1993). Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227–231.

(6) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Edsaile, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483–524.

(6a) Testimenetelmä B.40. Ihosyövyttävyys.

(7) Testimenetelmä B.4. Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.

(8) OECD (1996). OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Pidetty Solnassa, Ruotsissa, 22.–24. tammikuuta 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

▼B

(9) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, marraskuu 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(10) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

Taulukko 1

SILMÄVAURIOIDEN PISTEYTYS

Sarveiskalvo

Samentuma: tiheysaste (mittausarvot otettava tiheimmästä kohdasta) (*)	
Ei haavaumia tai samentumaa	0
Yksittäisiä tai hajanaisia samentuma-alueita (muu kuin lievä normaalin kiillon himmentyminen); värikalvon yksityiskohdat selvästi nähtävissä	1
Selvästi erottuva läpinäkyvä alue; värikalvon yksityiskohdat hiukan peittyneet	2
Helmiäishohtoinen alue; värikalvon yksityiskohtia ei erotu lainkaan; pupilli tuskin erottuva	3
Samea sarveiskalvo; värikalvo ei erotu samentuman läpi	4

Suurin mahdollinen pistemäärä: 4

HUOMAUTUKSET

(*) Sarveiskalvosamentuman alue on mainittava.

Värikalvo

Normaali	0
Selvästi syventyneet poimut, verentungosta, turvotusta, keskinkertaista verekkyyttä sarveiskalvon ympärillä; värikalvon reagoiminen valoon (viivästynyt reaktio katsotaan testiaineen vaikutukseksi)	1
Verenvuotoa, vakavasti tuhoutunut värikalvo tai ei reaktiota valoon	2

Suurin mahdollinen pistemäärä: 2

Sidekalvo

Normaali punaisuus (viittaa luomen ja silmämunan sidekalvoon; pois lukien sarveiskalvo ja värikalvo)	0
Joitakin hypereemisiä verisuonia	1
Laajalle levinnyt helakka punaisuus; yksittäiset suonet eivät erotu selvästi	2
Laajalle levinnyt voimakas punaisuus	3

Suurin mahdollinen pistemäärä: 3

Sidekalvopöhö

Turvotus (viittaa luomiin ja/tai vilkkukalvoon)	
Normaali	0
Hiukan normaalia enemmän turvotusta	1
Selvää turvotusta, luomet osittain kääntyneet ympäri	2
Turvotusta, luomet puoliksi muurautuneet umpeen	3
Turvotusta, luomet enemmän kuin puoliksi muurautuneet umpeen	4

Suurin mahdollinen pistemäärä: 4

▼B

LIITE

Silmä-ärsyttävyyden ja -syövyttävyyden vaiheittainen testaus

YLEISIÄ NÄKÖKOHTIA

Sekä järkevien tieteellisten menettelytapojen että eläinten hyvinvoinnin vuoksi on tärkeää välttää tarpeettomia eläinkokeita ja tehdä mahdollisimman vähän sellaisia testejä, jotka todennäköisesti aiheuttavat elämissä vakavia vasteita. Ennen *in vivo* -testin suunnittelemista on arvioitava kaikki tiedot testiaineen mahdollisesta silmä-ärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä. Riittävät todisteet testiaineen silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden luokittelemiseksi voivat jo olla olemassa, jolloin koe-eläintestejä ei tarvita. Painoarvoanalyysin ja vaiheittaisen menettelyn käyttö vähentää *in vivo* -testien tarvetta, erityisesti jos on todennäköistä, että testiaine aiheuttaa vakavia reaktioita.

On suositeltavaa arvioida aineiden silmä-ärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä saatavissa olevien tietojen painoarvo, jotta voidaan päättää, tarvitaanko aineen silmä-ärsyttävyyspotentiaalin määrittämiseksi muita testejä kuin *in vivo* -silmätesti. Jos muita testejä tarvitaan, on suositeltavaa käyttää vaiheittaista menettelyä relevanttien koetulosten hankkimiseksi. Jos ainetta ei ole testattu aikaisemmin, vaiheittaisen menettelyn avulla voidaan hankkia silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden arviointiin tarvittavat tulokset. Tässä liitteessä kuvattu testimenettely on kehitetty OECD:n seminaarissa (1), ja se on vahvistettu ja laajennettu myöhemmin järjestelmässä *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances,* sellaisena kuin se vahvistettiin kemikaalikomitean ja kemikaalityöryhmän 28. yhteisessä kokouksessa marraskuussa 1998 (2).

Vaikka tämä vaiheittainen testausstrategia ei ole olennainen osa testimenetelmää B.4, siinä kuvataan suositeltavaa lähestymistapaa aineen silmä-ärsyttävyys-/--syövyttävyysominaisuuksien määrittämiseen. Tämä lähestymistapa edustaa sekä parhaita käytäntöjä että eettistä vertailukohdetta silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden *in vivo* -testauksessa. Siinä annetaan ohjeita *in vivo* -testin suorittamiseen ja esitetään yhteenveto tekijöistä, jotka on käsiteltävä ennen testin aloittamista. Strategia tarjoaa lähestymistavan aiemmin saatujen tulosten arviointiin testiaineen silmä-ärsyttävyys-/-syövyttävyysominaisuuksien selvittämiseksi, ja sen avulla voidaan vaihe vaiheelta tuottaa merkitseviä tuloksia aineista, joista tarvitaan lisätietoja tai joita ei ole aikaisemmin tutkittu. Strategiassa suositellaan myös tietyissä tapauksissa käyttämään validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro*- tai *ex vivo* -testejä silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden toteamiseksi (3) (4).

VAIHEITTAISEN TESTAUSSTRATEGIAN KUVAUS

Ennen vaiheittaiseen menettelyyn sisältyvien testien suorittamista (kaavio) on analysoitava kaikki saatavissa olevat tiedot, jotta *in vivo* -silmätestauksen tarve voidaan määrittää. Vaikka yksittäisistä parametreista (esimerkiksi äärimmäiset pH-arvot) voidaan saada merkitseviä tietoja, on syytä ottaa huomioon tulokset kokonaisuudessaan. Kaikkien kyseessä olevan aineen tai sitä rakenteeltaan vastaavan aineen vaikutustietojen painoarvo on arvioitava testauspäätöksen yhteydessä, ja päätökselle on esitettävä perustelut. Ensisijaisesti on painotettava sekä ihmis- että eläintesteillä aineesta aiemmin saatuja tuloksia ja seuraavaksi *in vitro*- tai *ex vivo* -testien tuloksia. Syövyttävien aineiden in *vivo* -testejä on vältettävä aina kun se on mahdollista. Testimenettelyssä on otettava huomioon seuraavat asiat:

▼B

Ihmisillä ja eläimillä aiemmin saatujen tulosten arviointi (vaihe 1). Aiemmat ihmisillä saadut tulokset, esimerkiksi kliiniset tai työperäiseen altistukseen liittyvät tutkimustulokset ja tapausselostukset ja/tai eläinkokeiden tulokset silmätesteistä, on otettava ensiksi huomioon, koska niistä saadaan suoraan aineen silmävaikutuksiin liittyviä tietoja. Sen jälkeen on arvioitava saatavissa olevat tiedot ihmisillä ja/tai eläimillä tehdyistä ihoärsyttävyys/-syövyttävyystesteistä. Eläinten silmiin ei saa annostella aineita, joiden tiedetään olevan syövyttäviä tai voimakkaasti ärsyttäviä, eikä aineita, joilla on ihoa ärsyttävä/syövyttävä vaikutus; sellaisten aineiden voidaan katsoa vaikuttavan samoin myös silmiin. *In vivo* -testejä ei tarvitse tehdä aineille, joiden silmä-ärsyttävyys tai -syövyttävyys tiedetään, eikä aineille, joista on selvästi todistettu, että ne eivät ole ärsyttäviä tai syövyttäviä.

Rakenne-aktiivisuusanalyysi (SAR) (vaihe 2). Jos saatavilla on rakenteellisesti samankaltaisten aineiden testituloksia, ne on otettava huomioon. Kun rakenteellisesti samankaltaisista aineista tai niitä sisältävistä seoksista on saatavilla riittävästi ihmisille tehtyjen testien ja eläinkokeiden tuloksia, jotka osoittavat niiden silmä-ärsyttävyys/-syövyttävyyspotentiaalin, voidaan olettaa, että arvioitava testiaine tuottaa samanlaiset vasteet. Tällaisessa tapauksessa ainetta ei kenties tarvitse testata. Negatiiviset tulokset rakenteellisesti samankaltaisten aineiden tai sellaisista aineista koostuvien seosten tutkimuksista eivät vaiheittaisessa menettelyssä ole riittävä todiste siitä, että aine ei ole ärsyttävä tai syövyttävä. Sekä silmäettä ihoärsyttävyys ja -syövyttävyys on selvitettävä validoitujen ja hyväksyttyjen SAR-menettelytapojen avulla.

Fysikokemialliset ominaisuudet ja kemiallinen reaktiivisuus (vaihe 3). Aineella, jolla esiintyy äärimmäisiä pH-arvoja, kuten $\leq$ 2,0 ja $\geq$ 11,5, voi olla voimakkaita paikallisvaikutuksia. Jos aine määritetään silmää syövyttäväksi äärimmäisen pH-arvon perusteella, sen happo-/emäsreservi (eli puskurointikyky) voidaan myös ottaa huomioon (5) (6). Jos puskurointikyky viittaa siihen, että aine ei ole silmää syövyttävä, tämän vahvistamiseksi on tehtävä jatkotesti, jonka on ensisijaisesti oltava validoitu ja hyväksytty *in vitro*- tai *ex vivo* -testi (katso vaiheet 5 ja 6).

Muiden aiempien tietojen ottaminen huomioon (vaihe 4). Kaikki saatavissa olevat tiedot koko elimistöön ihon kautta kohdistuvasta toksisuudesta on arvioitava tässä vaiheessa. Testiaineen akuutti toksisuus ihon kautta saatuna on myös otettava huomioon. Jos testiaine on osoitettu erittäin toksiseksi ihon kautta saatuna, sitä ei kenties tarvitse testata silmille. Vaikkakaan akuutin ihotoksisuuden ja silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden välillä ei välttämättä ole suhdetta, voidaan olettaa, että jos aine on erittäin toksinen ihon kautta saatuna, se on erittäin toksinen myös silmään annosteltuna. Tällaiset tiedot voidaan ottaa huomioon myös vaiheiden 2 ja 3 välissä.

In vitro- tai ex vivo -testien tulokset (vaiheet 5 ja 6). Aineita, joilla on todettu olevan syövyttäviä tai vakavasti ärsyttäviä ominaisuuksia validoiduissa ja hyväksytyissä, nimenomaan silmä- ja ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden mittaamista varten kehitetyissä *in vitro*- tai *ex vivo* -testeissä (7)(8), ei tarvitse testata eläimillä. Voidaan olettaa, että tällaiset aineet aiheuttavat samoja vaikutuksia *in vivo* -testeissä. Jos validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro- / ex vivo* -testejä ei ole saatavissa, vaiheet 5 ja 6 ohitetaan ja siirrytään suoraan vaiheeseen 7.

Testiaineen in vivo -ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden arviointi (vaihe 7). Kun testiaineesta ei ole saatavilla riittäviä todisteita painoarvoanalyysin ja lopullisen johtopäätöksen tekemiseksi testiaineen ihoärsyttävyys/-syövyttävyyspotentiaalista edellä lueteltujen tutkimusten tietojen perusteella, *in vivo* -ihoärsyttävyys/-syövyttävyyspotentiaali on arvioitava ensiksi testimenetelmän B.4 (4) ja sen liitteen mukaisesti (9). Jos aineen on osoitettu aiheuttavan ihon syöpymistä tai vakavaa ärsytystä, sitä on syytä pitää syövyttävänä ja silmä-ärsytystä aiheuttavana, mikäli muut tiedot eivät tue toisenlaista johtopäätöstä. Tällöin *in vivo* -silmätestiä ei tarvita. Jos aine ei ole ihoa syövyttävä tai vakavasti ärsyttävä, *in vivo* -silmätesti on tehtävä.

▼B

In vivo -testi kaniineilla (vaiheet 8 ja 9). In vivo -silmätesti on aloitettava testaamalla ensin yksi eläin. Jos tämän testin tulokset osoittavat, että aine on silmiä vakavasti ärsyttävä tai syövyttävä, jatkotestiä ei pidä tehdä. Jos alkutestissä ei todeta vakavasti ärsyttävää tai syövyttävää vaikutusta, ärsyttävyys tai negatiivinen vaste on vahvistettava testaamalla vielä enintään kaksi eläintä.

LÄHDELUETTELO

1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Pidetty Solnassa, Ruotsissa 22.–24. tammikuuta 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2) OECD (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, marraskuu 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3) Worth, A. P. and Fentem J. H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161–177.

4) Testimenetelmä B.4. Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.

5) Young, J. R., How, M. J., Walker, A. P., Worth, W. M. H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19–26.

6) Neun, D. J. (1993). Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227–231.

7) Fentem, J. H., Archer, G. E. B., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Edsail, D. J., Holzhutter, H. G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483–524.

8) Testimenetelmä B.40. Ihosyövyttävyys.

9) Testimenetelmän B.4 liite: Ihoärsyttävyyden ja -syövyttävyyden vaiheittainen tutkimusmenettely.

▼B

Kaavio

SILMÄ-ÄRSYTTÄVYYDEN/-SYÖVYTTÄVYYDEN TESTAUS- JA ARVIOINTIMENETTELY

	Toimi	Löydös	Johtopäätös
1	Aiemmat tulokset ihmisistä tai eläimistä osoittavat silmäreaktioita	Vakavia silmävaurioita aiheuttava	Apikaalinen päätepiste; katsotaan syövyttäväksi silmille. Testiä ei tarvita.
		Silmiä ärsyttävä	Apikaalinen päätepiste; katsotaan ärsyttäväksi silmille. Testiä ei tarvita.
		Ei silmiä syövyttävä eikä ärsyttävä	Apikaalinen päätepiste; katsotaan, että aine ei ole silmiä syövyttävä eikä ärsyttävä. Testiä ei tarvita.
	Aiemmat tulokset ihmisistä ja/tai eläimistä osoittavat ihon syöpymisvaikutuksia	Ihoa syövyttävä	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	Aiemmat tulokset ihmisistä ja/tai eläimistä osoittavat vakavia ihoärsytysvaikutuksia	Vakavaa ihoärsytystä aiheuttava	Oletetaan silmiä ärsyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	Tietoja ei saatavilla tai saatavat tiedot eivät mahdollista lopullista johtopäätöstä		
	↓		
2	Suorita silmäsyövyttävyyden/-ärsyttävyyden SAR-arviointi	Ennustaa vakavia silmävaurioita	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
		Ennustaa silmä-ärsytystä	Oletetaan silmiä ärsyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	Suorita ihosyövyttävyyden SAR-arviointi	Ennustaa ihosyövyttävyyttä	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	Ennusteita ei voida tehdä tai ennusteet ovat negatiivisia tai eivät mahdollista lopullista johtopäätöstä		
	↓		
3	Mittaa pH (puskurointikyky tarpeen mukaan)	pH ≤ 2 tai ≥ 11,5 (suuri puskurointikyky, jos relevanttia)	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	2< pH < 11,5, tai pH ≤ 2,0 tai ≥ 11,5 ja puskurointikyky alhainen tai olematon, jos relevanttia		
	↓		
4	Arvioi ihon kautta koko elimistöön kohdistuva toksisuus	Erittäin toksinen silmätestauksissa käytettävinä pitoisuuksina.	Aine on liian toksinen testattavaksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	Mainittuja tietoja ei ole saatavilla tai aine ei ole kovin toksinen		
	↓		

▼B

5	Suorita validoitu ja hyväksytty *in vitro*- tai *ex vivo* -testi silmäsyövyttävyyden toteamiseksi	Syöpymisvaste	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	Aine ei ole syövyttävä tai validoitu In vitro- tai ex vivo *-testimenetelmiä silmäsyövyttävyyden osoittamiseksi ei ole vielä saatavilla*		
	↓		
6	Suorita validoitu ja hyväksytty *in vitro* tai *ex vivo*-testi silmä-ärsyttävyyden toteamiseksi	Ärsytysvaste	Oletetaan silmiä ärsyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	Aine ei ole ärsyttävä tai validoitu In vitro- tai ex vivo *-testimenetelmiä silmä-ärsytyksen toteamiseksi ei ole vielä saatavilla*		
	↓		
7	Arvioi kokeellisesti *in vivo* -ihoärsyttävyys/-syövyttävyyspotentiaali (katso testimenetelmä B.4 ja sen liite)	Syöpymisvaste tai vakava ärsytysvaste	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	Aine ei ole syövyttävä tai vakavasti ihoa ärsyttävä		
	↓		
8	Suorita *in vivo* -alkutesti yhdelle kaniinille silmävaikutuksen toteamiseksi	Vakavia silmävaurioita	Katsotaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	Ei vakavia vaurioita tai ei vastetta		
	↓		
9	Suorita vahvistustesti vielä yhdelle tai kahdelle eläimelle	Syövyttävä tai ärsyttävä	Katsotaan silmiä syövyttäväksi tai ärsyttäväksi. Jatkotestiä ei tarvita.
		Ei syövyttävä eikä ärsyttävä	Katsotaan, että aine ei ole ärsyttävä eikä syövyttävä. Jatkotestiä ei tarvita.

▼B

B.6. IHON HERKISTYMINEN

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Huomautukset:

Testien herkkyys ja kyky havaita ihmisen ihoa mahdollisesti herkistäviä aineita on tärkeä kansanterveyteen liittyvän toksisuuden luokitusjärjestelmän kannalta.

Kaikkia ihmisen ihoa mahdollisesti herkistäviä aineita ei voida adekvaatisti tunnistaa millään yksittäisellä testimenetelmällä, joka myös sopisi kaikille aineille.

Sellaiset tekijät kuten aineen fysikaaliset ominaisuudet, mukaan lukien sen ihon läpäisykyky, on otettava huomioon testin valinnassa.

On kehitetty kahdentyyppisiä marsutestejä: adjuvanttityyppiset testit, joissa allergista tilaa voimistetaan liuottamalla tai suspensoimalla testiaine Freundin täydelliseen adjuvanttiin (FCA, Freunds Complete Adjuvant), ja muut kuin adjuvanttitestit.

Adjuvanttityyppiset testit todennäköisesti ennustavat aineen ihmisen ihoa mahdollisesti herkistävää vaikutusta tarkemmin kuin menetelmät, joissa ei käytetä FCA:ta, minkä vuoksi adjuvantti-tyyppisiä testejä suositaan.

Marsun maksimaatiotesti (Guinea-Pig Maximisation test, GPMT) on laajalti käytetty adjuvantti-tyyppinen testi. Vaikka aineen ihon herkistämisriski voidaan todeta useilla muillakin menetelmillä, marsun maksimaatiotesti on suositeltavin adjuvanttimenetelmistä.

Monien kemikaalien kohdalla muita kuin adjuvanttitestejä (joista suositeltavin on Buehlerin testi) pidetään vähemmän herkkinä.

Tietyissä tapauksissa voi olla perusteltua valita Buehlerin testi, jossa aine annostellaan paikallisesti eikä ihonsisäisesti kuten marsun maksimaatiotestissä. Buehlerin testin käytölle on esitettävä tieteelliset perusteet.

Marsun maksimaatiotesti ja Buehlerin testi kuvataan tässä menetelmässä. Myös muita menetelmiä voidaan käyttää edellyttäen, että ne on validoitu hyvin ja niiden käyttö on tieteellisesti perusteltua.

Jos tunnustetussa seulontatutkimuksessa saadaan positiivinen tulos, testiaine voidaan määrittää mahdollisesti herkistäväksi aineeksi eikä ole tarpeen enää tehdä marsutestiä. Jos tunnustetussa seulontatutkimuksessa saadaan negatiivinen tulos, marsutesti on tehtävä tämän testimenetelmän yhteydessä kuvattua menetelmää käyttäen.

Ks. myös yleisjohdanto, osa B.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ihon herkistyminen: (allerginen kosketusihottuma) Aineen aiheuttama immunologisesti välittyvä ihoreaktio. Ihmisellä vastereaktio voi olla kutina, punoitus, turvotus, näppylät, vesirakkulat, vesikellot tai jokin näiden yhdistelmä. Muilla eläinlajeilla reaktiot voivat olla erilaisia ja vain punoitusta ja turvotusta voi esiintyä.

Induktioaltistus: Koehenkilön kokeellinen altistaminen testiaineelle tarkoituksena aikaansaada yliherkistymistila.

Induktiojakso: Induktioaltistusta seuraava vähintään viikon kestävä jakso, jonka aikana yliherkistymistila voi kehittyä.

Haastealtistus: Aiemmin käsitellyn koehenkilön kokeellinen altistaminen testiaineelle induktiojakson jälkeen koehenkilön mahdollisen yliherkistymisreaktion määrittämiseksi.

1.3. VERTAILUAINEET

Käytetyn koemenetelmän herkkyys ja luotettavuus tulee tutkia puolen vuoden välein aineilla, joiden tiedetään herkistävän ihoa lievästi tai kohtalaisesti.

Oikein suoritetussa adjuvanttitestissä vasteen voidaan odottaa olevan vähintään 30 % ja muussa kuin adjuvanttitestissä vähintään 15 % lievillä/kohtalaisilla herkistäjillä.

Seuraavia aineita suositellaan:

CAS-numerot	EINECS-numerot	EINECS-nimet	Geneeriset nimet
101-86-0	202-983-3	α-heksyylisinnaamialdehydi	α-heksyylisinnaamialdehydi
149-30-4	205-736-8	bentsotiatsoli-2-tioli (merkaptobentsotiatsoli)	kaptaksi
94-09-7	202-303-5	bentsokaiini	norkaiini

Joissakin olosuhteissa voidaan riittävin perustein käyttää muita vertailuaineita, jotka täyttävät edellä mainitut perusteet.

1.4 KOEMENETELMÄN PERIAATE

Koe-eläimet altistetaan testiaineelle aluksi ruiskuttamalla ainetta ihonsisäisesti ja/tai levittämällä sitä iholle (induktioaltistus). Lepojakson (10–14 vrk:n induktiojakso) aikana voi kehittyä immuunivaste. Lepojakson jälkeen eläimet altistetaan haasteannokselle. Haastealtistuksen testiryhmässä aiheuttamaa ihoreaktion laajuutta ja voimakkuutta verrataan verrokkieläimiin, joille annetaan induktion aikana lumekäsittely, mutta jotka saavat kuitenkin haastealtistuksen.

1.5 KOEMENETELMIEN KUVAUS

Jos testiaine on välttämättä poistettava, se tulee tehdä vedellä ja sopivalla liuottimella niin ettei saavutettu vaste muutu eikä ihon pinta rikkoonnu.

▼B

1.5.1 *Marsun maksimaatiotesti*

1.5.1.1 Valmistelut

Terveet nuoret täysikasvuiset albiinomarsut totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen testiä. Ennen testiä eläimet jaetaan satunnaisotannalla testi- ja verrokkiryhmiin. Karvat poistetaan leikkaamalla, ajelemalla tai mahdollisesti kemiallisella depilaatiolla käytetystä testimenetelmästä riippuen. Varovaisuutta on noudatettava, ettei iho naarmuunnu rikki. Eläimet punnitaan ennen testiä ja sen jälkeen.

1.5.1.2 Koeolosuhteet

1.5.1.2.1 Koe-eläimet

Koe-eläiminä käytetään yleisesti käytettyjä albiinomarsun laboratoriokantoja.

1.5.1.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Testissä voidaan käyttää sekä uroksia että naaraita. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Testiryhmässä on oltava vähintään kymmenen eläintä ja verrokkiryhmässä vähintään viisi. Testeissä, joissa on käytetty alle 20 testimarsua ja alle 10 verrokkimarsua, eikä testiaineen herkistävyydestä voida tehdä johtopäätöksiä, suositellaan voimakkaasti lisätestejä siten, että testieläimiä on yhteensä vähintään 20 ja verrokkieläimiä kymmenen.

1.5.1.2.3 Annostasot

Testiaineen pitoisuus kutakin induktioaltistusta kohti tulee olla hyvin siedetty systeemisesti ja korkein mahdollinen lievän tai kohtalaisen ihoärsytyksen aiheuttamiseksi. Haastealtistuspitoisuuden tulee olla suurin ärsyttämätön annos. Mikäli on tarpeen, sopivat pitoisuudet voidaan määrittää esitutkimuksessa kahdella tai kolmella eläimellä. Tähän tarkoitukseen tulisi käyttää FCA:lla käsiteltyjä eläimiä.

1.5.1.3 Kokeen suorittaminen

1.5.1.3.1 Induktio

Päivä 0 — testiryhmä

Lapojen alueelle, jolta on poistettu karvat, pistetään kuusi ihonsisäistä 0,1 ml:n ruisketta pareittain siten, että puolet (3) on keskiviivan vasemmalla ja puolet (3) oikealla puolella.

1. ruiske: 1:1 sekoitus (v/v) FCA:ta ja vettä tai fysiologista keittosuolaliuosta

2. ruiske: testiaine sopivassa vehikkelissä valitulla pitoisuudella

3. ruiske: testiaine valitulla pitoisuudella 1:1 seoksessa (v/v) FCA:ta ja vettä tai fysiologista keittosuolaliuosta.

Kolmannen ruiskeen vesiliukoiset aineet liuotetaan vesifaasiin ennen FCA:han sekoittamista. Rasvaliukoiset tai liukenemattomat aineet suspensoidaan FCA:han ennen vesifaasiin yhdistämistä. Testiaineen lopullisen pitoisuuden on oltava sama kuin toisessa ruiskeessa.

▼B

Ensimmäinen ja toinen ruiske pistetään lähekkäin lähimmäksi päätä. Kolmas ruiske pistetään testialueen hännänpuoleiseen osaan.

Päivä 0 — verrokkiryhmä

Kuusi ihonsisäistä 0,1 ml:n ruisketta pistetään samoihin kohtiin kuin testiryhmään kuuluville eläimille.

1. ruiske: 1:1 seos (v/v) FCA:ta ja vettä tai fysiologista keittosuolaliuosta

2. ruiske: laimentamatonta vehikkeliä

3. ruiske: 50-prosenttinen v/v -sekoitus vehikkeliä FCA:n ja veden tai fysiologisen keittosuolaliuoksen seoksessa suhteessa 1:1 (v/v).

Päivät 5. – 7. — testi- ja verrokkiryhmät

Jos aine on ihoa ärsyttämätön, testialuetta käsitellään noin 24 tuntia ennen paikallista induktiota karvojen huolellisen poisleikkaamisen ja/tai ajelemisen jälkeen 0,5 ml:lla 10-prosenttista natrium-lauryylisulfaatti-vaseliinia paikallisärsytyksen aiheuttamiseksi.

Päivät 6. – 8. — testiryhmä

Testialueelta poistetaan jälleen karvat. Sopivassa vehikkelissä olevalla testiaineella läpikotaisin kyllästetty suodatinpaperi (2 x 4 cm) asetetaan testialueelle ihoa vasten ja peitetään okkluusiositeellä 48 tunniksi. Vehikkelin valinta tulee perustella. Kiinteät aineet hienonnetaan ja yhdistetään sopivaan vehikkeliin. Nesteitä voidaan käyttää laimentamattomina, jos se on tarkoituksenmukaista.

Päivät 6. – 8. — verrokkiryhmä

Testialueelta poistetaan jälleen karvat. Pelkkä vehikkeli asetetaan testiaineen tavoin testialueelle ja peitetään okkluusiositeellä 48 tunniksi.

1.5.1.3.2 Haastealtistus

Päivät 20. – 22. — testi- ja verrokkiryhmät

Testi- ja verrokkieläinten kyljistä poistetaan karvapeite. Testiaineella kyllästetty lappu tai kupu asetetaan eläinten toiseen kylkeen ja tarvittaessa pelkällä vehikkelillä kyllästetty lappu tai kupu toiseen kylkeen. Lappujen annetaan olla ihoa vasten okkluusiositeen alla 24 tuntia.

1.5.1.3.3 Havainnointi ja pisteytys: testi- ja verrokkiryhmät

— noin 21 tuntia lapun poistamisen jälkeen haastealue puhdistetaan ja tarvittaessa karvat leikataan huolellisesti pois ja/tai ajellaan tai poistetaan depilaatiolla,

— noin kolme tuntia myöhemmin (noin 48 tunnin kuluttua haastealtistuksen aloittamisesta) havainnoidaan ihoreaktiota ja kirjataan se liitteen pisteytysasteikon mukaisesti,

— noin 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä havainnoinnista ihoreaktiota havainnoidaan uudestaan (72 h) ja tulokset kirjataan jälleen.

Testi- ja verrokkieläinten sokkoarviointia suositellaan.

Jos ensimmäisen haastealtistuksen tulokset vaativat selventämistä, on harkittava haastealtistuksen uusimista mahdollisesti uudella verrokkiryhmällä, jos se on tarkoituksenmukaista, noin viikon kuluttua ensimmäisestä haastealtistuksesta. Haastealtistus voidaan uusia myös alkuperäisellä verrokkiryhmällä.

▼B

Kaikki induktiosta ja haastetoimenpiteistä johtuvat ihoreaktiot ja epätavalliset löydökset, mukaan lukien systeemiset reaktiot, tulee havainnoida ja kirjata Magnusson/Kligman -pisteytysasteikon mukaan (ks. liite). Muita toimenpiteitä, esimerkiksi histopatologinen tutkimus ja ihopoimumittaus, voidaan suorittaa epäilyttävien reaktioiden selventämiseksi.

1.5.2 *Buehlerin testi*

1.5.2.1 Valmistelut

Terveet nuoret täysikasvuiset albiinomarsut totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen testiä. Ennen testiä eläimet jaetaan satunnaisotannalla testi- ja verrokkiryhmiin. Karvat poistetaan leikkaamalla, ajelemalla tai mahdollisesti kemiallisella depilaatiolla käytetystä testimenetelmästä riippuen. Varovaisuutta on noudatettava, ettei ihon pinta naarmuunnu rikki. Eläimet punnitaan ennen testiä ja sen jälkeen.

1.5.2.2 Koeolosuhteet

1.5.2.2.1 Koe-eläimet

Koe-eläiminä käytetään yleisesti käytettyjä albiinomarsun laboratoriokantoja.

1.5.2.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Testissä voidaan käyttää sekä uroksia että naaraita. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Testiryhmässä on oltava vähintään 20 eläintä ja verrokkiryhmässä vähintään kymmenen.

1.5.2.2.3 Annostasot

Testiaineen pitoisuuden kutakin induktioaltistusta kohti tulee olla korkein mahdollinen lievän, mutta ei liiallisen ärsytyksen tuottamiseksi. Haastealtistuspitoisuuden tulee olla suurin ärsyttämätön annos. Mikäli on tarpeen, sopivat pitoisuudet voidaan määrittää esitutkimuksessa kahdella tai kolmella eläimellä.

Vesiliukoisten testiaineiden vehikkeliksi sopii vesi tai laimennettu ärsyttämätön pinta-aktiivinen liuos. Muiden testiaineiden vehikkeliksi suositellaan 80-prosenttista etanoli-vesiliuosta induktioon ja asetonia haastealtistukseen.

1.5.2.3 Kokeen suorittaminen

1.5.2.3.1 Induktio

Päivä 0 — testiryhmä

Eläimen toisesta kyljestä leikataan huolellisesti karvat pois. Testilapun tulee olla läpikotaisin kyllästetty sopivaan vehikkeliin (vehikkelin valinta tulee perustella; nestemäisiä testiaineita voidaan käyttää laimentamattomina, jos se on tarkoituksenmukaista) sekoitetulla testiaineella.

Testilappu asetetaan testialueelle ihoa vasten ja peitetään tiiviillä lapulla tai kuvulla ja sopivalla siteellä kuudeksi tunniksi.

▼B

Testilappujärjestelmän on oltava okklusiivinen. Tarkoitukseen sopii pyöreä tai neliskulmainen vanulappu, jonka pinta-ala on 4–6 cm^2. Tiiviyden varmistamiseen suositellaan sopivaa kiinnitysmekanismia. Kääreitä käytettäessä voidaan tarvita lisäaltistuskertoja.

Päivä 0 — verrokkiryhmä

Eläimen toisesta kyljestä leikataan huolellisesti karvat pois. Pelkkä vehikkeli asetetaan samoin kuin testiryhmässä. Testilapun annetaan olla ihoa vasten tiiviin lapun tai kuvun ja sopivan siteen alla kuusi tuntia. Jos voidaan osoittaa, ettei lumeverrokkiryhmää tarvita, voidaan käyttää käsittelemätöntä verrokkiryhmää.

Päivät 6.–8. ja 13.–15. — testi- ja verrokkiryhmät

Päivän 0 toimenpiteet tehdään samalle testialueelle (jolta poistetaan tarvittaessa karvat) eläimen samaan kylkeen päivinä 6.–8. ja uudelleen päivinä 13.–15.

1.5.2.3.2 Haastealtistus

Päivä 27.–29. — testi- ja verrokkiryhmät

Testi- ja verrokkiryhmien eläinten käsittelemättömästä kyljestä poistetaan karvat (huolellisesti leikkaamalla). Tiivis lappu tai kupu, joka sisältää sopivan määrän testiainetta korkeimpana mahdollisena ärsyttämättömänä pitoisuutena, asetetaan molempien ryhmien eläinten käsittelemättömän kyljen takaosaan.

Tarvittaessa asetetaan myös pelkkää vehikkeliä sisältävä tiivis lappu tai kupu molempien ryhmien eläinten käsittelemättömän kyljen etuosaan. Lappujen tai kupujen annetaan olla ihoa vasten sopivalla siteellä peitettyinä kuusi tuntia.

1.5.2.3.3 Havainnointi ja pisteytys

— noin 21 tuntia lapun poistamisen jälkeen haastealueelta poistetaan karvat,

— noin kolme tuntia myöhemmin (noin 30 tunnin kuluttua haastelapun asettamisesta) havainnoidaan ihoreaktioita ja kirjataan ne liitteen pisteytysasteikon mukaisesti,

— noin 24 tunnin kuluttua 30 ensimmäisen tunnin jälkeen suoritetusta havainnointikerrasta (noin 54 tuntia haastelapun asettamisesta) havainnoidaan ihoreaktioita uudelleen ja tulokset kirjataan.

Testi- ja verrokkieläinten sokkoarviointia suositellaan.

Jos ensimmäisen haastealtistuksen tulokset vaativat selventämistä, on harkittava haastealtistuksen uusimista mahdollisesti uudella verrokkiryhmällä, jos se on tarkoituksenmukaista, noin viikon kuluttua ensimmäisestä haastealtistuksesta. Haastealtistus voidaan uusia myös alkuperäisellä verrokkiryhmällä.

▼B

Kaikki induktiosta ja haastetoimenpiteistä johtuvat ihoreaktiot ja epätavalliset löydökset, mukaan lukien systeemiset reaktiot, tulee havainnoida ja kirjata Magnusson/Kligman -pisteytysasteikon mukaan (ks. liite). Muita toimenpiteitä, esimerkiksi histopatologinen tutkimus ja ihopoimumittaus, voidaan suorittaa epäilyttävien reaktioiden selventämiseksi.

2. **TULOKSET (GPMT JA BUEHLERIN TESTI)**

Yhteenveto tuloksista tulee esittää taulukossa, josta ilmenee kunkin eläimen ihoreaktiot kullakin havainnointikerralla.

3. **RAPORTOINTI (GPMT JA BUEHLERIN TESTI)**

Jos seulontatesti tehdään ennen marsutestiä, testin (esim. paikallinen imusolmuketesti, LLNA; hiiren korvan turpoamistesti, MEST) kuvaus tai viite, mukaan lukien toimenpiteen yksityiskohdat, on ilmoitettava testi- ja vertailuaineella saatujen tulosten yhteydessä.

Testiraportti (GPMT ja Buehlerin testi)

Testiraportin tulee mahdollisuuksien mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet:

— käytetty marsukanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne., ja

— kunkin eläimen paino testin alussa.

Koeolosuhteet:

— lapun asettamiskohdan valmistelumenetelmä,

— käytettyjen lappumateriaalien ja lappujen asettamismenetelmän yksityiskohdat,

— esitutkimustulokset ja niiden pohjalta tehty johtopäätös testissä käytettävistä induktio- ja haastepitoisuuksista,

— testiaineen valmistamisen, asettamisen ja poistamisen yksityiskohdat,

— vehikkelin valintaperusteet, ja

— induktio- ja haastealtistuksissa käytetyt vehikkeli- ja testiainepitoisuudet sekä induktiossa ja haastealtistuksessa käytetyn aineen kokonaismäärä.

Tulokset:

— yhteenveto tuoreimman herkkyys- ja luotettavuustarkistuksen tuloksista (ks. 1.3) mukaan lukien tiedot käytetystä aineesta, pitoisuudesta ja vehikkelistä,

▼B

— kunkin eläimen kohdalta mukaan lukien pisteytysjärjestelmä,

— selostuskuvaus havaittujen vaikutusten luonteesta ja voimakkuudesta, ja

— mahdolliset histopatologiset löydökset.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

4. **LÄHDELUETTELO**

Tämä menetelmä on analoginen OECD TG 406:n kanssa.

▼B

Lisäys

TAULUKKO

Magnusson/Kligman -pisteytysasteikko haastelapputestireaktioiden arvioimiseksi

0 = ei silmin havaittavia muutoksia

1 = lievä tai laikukas punoitus

2 = kohtalainen ja yhtenäinen punoitus

3 = voimakas punoitus ja turvotus

▼M4

B.7 ORAALINEN TOISTUVAN ANNOSTELUN TOKSISUUSTUTKIMUS (28 PV) JYRSIJÖILLÄ

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 407 (2008). Alkuperäinen testiohje nro 407 hyväksyttiin vuonna 1981. Vuonna 1995 hyväksyttiin tarkistettu versio, jonka tavoitteena oli saada lisätietoja tutkimuksessa käytetystä eläimestä eritoten neurotoksisuuden ja immunotoksisuuden osalta.

2. Vuonna 1998 OECD aloitti tärkeän toimenpiteen, olemassa olevien testiohjeiden uudistuksen ja uusien testiohjeiden laatimisen mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden seulontaa ja testausta varten (8). Osa tätä toimenpidettä oli ajantasaistaa OECD:n olemassa olevaa ohjetta ”Oraalinen toistuvan annostelun toksisuustutkimus (28 pv) jyrsijöillä” (TG 407) parametreilla, joilla voidaan havaita testikemikaalien hormonitoimintaan kohdistuva vaikutus. Tämä menettely kävi läpi laajan kansainvälisen ohjelman, jossa testattiin uusien parametrien merkityksellisyys ja käytännöllisyys, näiden parametrien suorituskyky (anti)estrogeenisia, (anti)androgeenisia ja kilpirauhasen toimintaa estäviä vaikutuksia omaaviin kemikaaleihin nähden, laboratorion sisäinen ja laboratorioiden välinen toistettavuus sekä se, häiritsevätkö uudet parametrit ohjeen TG 407 vanhemmassa versiossa vaadittuja parametreja. Näin saatu valtava määrä tietoa on koottu yhteen ja arvioitu yksityiskohtaisesti OECD:n kattavassa raportissa (9). Tämä ajantasaistettu testimenetelmä B.7 (joka vastaa ohjetta TG 407) perustuu kansainvälisen testiohjelman aikana saatuihin kokemuksiin ja tuloksiin. Tämän testimenetelmän avulla hormonivälitteisiä vaikutuksia voidaan tarkastella muiden toksikologisten vaikutusten yhteydessä.

ALUSTAVAT HUOMIOT JA RAJOITUKSET

3. Kun määritetään ja arvioidaan kemikaalin myrkyllisyysominaisuuksia, toistettujen annosten aiheuttama oraalinen myrkyllisyys voidaan määrittää sen jälkeen, kun akuutin myrkyllisyyden testistä on saatu alustavia tietoja myrkyllisyydestä. Tällä testimenetelmällä voidaan tutkia hyvin monenlaisia mahdollisia kohteita, joihin myrkylliset vaikutukset voivat kohdistua. Se antaa tietoa mahdollisista terveyshaitoista, joita todennäköisesti seuraa toistuvasta altistuksesta suhteellisen lyhyen ajan kuluessa, mukaan luettuina hermostoon sekä immuuni- ja hormonijärjestelmiin kohdistuvat vaikutukset. Näiden erityisten tutkittavien ominaisuuksien osalta menetelmän avulla on voitava tunnistaa kemikaalit, jotka saattavat olla neurotoksisia, jolloin tarkemmat asiaa koskevat tutkimukset saattavat olla tarpeen, sekä kemikaalit, jotka häiritsevät kilpirauhasen fysiologiaa. Menetelmä voi myös tuottaa tietoa kemikaaleista, jotka vaikuttavat uroksen ja/tai naaraan lisääntymiselimiin nuorilla eläimillä, ja sen avulla voidaan saada myös viitteitä immunologisista vaikutuksista.

4. Tällä B.7-testimenetelmällä saatavia tuloksia on käytettävä vaarojen tunnistamisessa ja riskinarvioinnissa. Hormonitoimintaan liittyvien parametrien avulla saatuja tuloksia on tarkasteltava OECD:n asiakirjaan ”Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (11) (hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva toimintamalli) liittyvässä kontekstissa. Menetelmä koostuu tavanomaisesta toistuvan annoksen myrkyllisyystutkimuksesta, jota voidaan käyttää sellaisten kemikaalien testaamisessa, joiden osalta 90 päivän tutkimus ei ole perusteltu (kun esimerkiksi tuotantomäärä ei ylitä tiettyjä rajoja), tai pitkäaikaisen tutkimuksen esitutkimuksena. Altistuksen on kestettävä 28 päivää.

▼M4

5. Kansainvälinen ohjelma, joka koski sellaisten parametrien validointia, joiden avulla voidaan mahdollisesti havaita testikemikaalin hormonitoimintaan kohdistuva vaikutus, osoitti, että testauslaboratorion kokemus vaikuttaa suuresti testimenetelmällä B.7 saatujen tietojen laatuun. Tämä liittyy varsinkin naaraiden lisääntymiselimissä tapahtuvien syklisten muutosten histopatologiseen määrittämiseen sekä pienten hormoneista riippuvaisten elinten painon määrittämiseen, koska näitä elimiä on vaikea dissekoida. Histopatologiaa koskevia ohjeita on laadittu (19). Ne ovat saatavilla OECD:n julkisella verkkosivustolla kemikaalien testausta käsittelevässä kohdassa. Ohjeet on tarkoitettu patologeille avuksi tutkimuksiin ja määritysmenetelmän herkkyyden parantamiseen. Useiden parametrien havaittiin antavan viitteitä hormonitoimintaan liittyvästä myrkyllisyydestä, ja ne on sisällytetty testimenetelmään. Parametreja, joista oli saatavilla käyttökelpoisuuden vahvistamisen kannalta liian vähän tietoa, tai joiden kyvystä auttaa havaitsemaan hormonaalisia haitta-aineita saatiin validointiohjelmassa vain heikkoa näyttöä, ehdotetaan käytettäväksi valinnaisina päätepisteinä (katso lisäys 2).

6. Validointiprosessissa saatujen tietojen perusteella on korostettava, että tämän menetelmän herkkyys ei riitä kaikkien sellaisten aineiden tunnistamiseen, joilla on (anti)androgeenisia tai (anti)estrogeenisia vaikutustapoja (9). Testimenetelmää ei käytetä siinä elämänvaiheessa, joka on herkin hormonaalisille häiriöille. Validointiprosessin aikana testimenetelmällä tunnistettiin kuitenkin aineita, jotka vaikuttavat kilpirauhasen toimintaan heikosti ja voimakkaasti, sekä hormonitoimintaan estrogeeni- tai androgeenireseptoreiden kautta voimakkaasti tai kohtalaisesti vaikuttavia aineita, mutta useimmissa tapauksissa menetelmällä ei pystytty tunnistamaan sellaisia hormonitoimintaan vaikuttavia aineita, jotka vaikuttavat estrogeeni- tai androgeenireseptoreihin heikosti. Sitä ei siis voida pitää hormonitoimintaan kohdistuvan vaikutuksen seulontamenetelmänä.

7. Vastaavasti näihin vaikutustapoihin liittyvien vaikutusten puuttumista ei voida pitää osoituksena hormonijärjestelmään kohdistuvien vaikutusten puuttumisesta. Hormonivälitteisten vaikutusten osalta aineen luonnehdinnan ei tule sen vuoksi perustua pelkästään tällä testimenetelmällä saatuihin tuloksiin, vaan niitä tulee käyttää näyttöön perustuvan toimintatavan yhteydessä, ja siihen on sisällytettävä kaikki kemikaalista olemassa olevat tiedot, jotta mahdollista hormonitoimintaan vaikutusta voidaan luonnehtia. Tästä syystä sääntelyyn liittyvässä päätöksenteossa, joka koskee hormonitoimintaan kohdistuvia vaikutuksia (aineen luonnehdinta), on sovellettava laaja-alaista lähestymistapaa, eikä siinä tule tukeutua pelkästään tätä testimenetelmää soveltaen saatuihin tuloksiin.

8. Kaikissa eläimiin liittyvissä menettelyissä on noudatettava paikallisia eläintenhoitovaatimuksia. Jäljempänä olevat kuvaukset eläinten hoidosta ja käsittelystä ovat vähimmäisvaatimuksia, ja paikalliset määräykset ovat niihin nähden ensisijaisia, jos ne ovat tiukempia. OECD on antanut lisäohjeita eläinten humaanista käsittelystä (14).

9. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

10. Testikemikaali annostellaan useille koe-eläinryhmille suun kautta päivittäin asteittain suurenevina annoksina siten, että yksi ryhmä saa aina yhtä annostasoa 28 päivän ajan. Annostelujakson aikana eläimiä havainnoidaan tarkoin päivittäin toksisuusoireiden varalta. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus. Kahdenkymmenenkahdeksan päivän mittainen tutkimus antaa tietoa toistuvan oraalisen altistuksen vaikutuksesta, ja siitä voidaan myös saada viitteitä pitempiaikaisten tutkimusten

▼M4

tarpeesta. Lisäksi tutkimus voi antaa tietoa pitoisuuksien valinnasta pitkäaikaisia tutkimuksia varten. Testimenetelmän avulla saatujen tietojen perusteella tulisi voida luonnehtia testikemikaalin myrkyllisyyttä, jotta annos-vastesuhde ja taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL), voidaan määrittää.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

11. Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, mutta muitakin jyrsijöitä voidaan käyttää. Jos tässä testimenetelmässä B.7 määritettyjä parametreja tutkitaan muilla jyrsijöillä, on esitettävä yksityiskohtainen perustelu. Vaikka on biologisesti todennäköistä, että muut lajit reagoivat myrkkyihin samalla tavoin kuin rotta, pienempien lajien käyttö voi kuitenkin lisätä vaihtelua pienempien elinten dissekoimiseen liittyvien teknisten haasteiden vuoksi. Kansainvälisessä validointiohjelmassa, jossa tutkittiin hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemista, rotta oli ainoa käytetty laji. Testissä tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koe-eläinkantoja. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Annostelun tulee alkaa mahdollisimman pian vieroituksen jälkeen ja ainakin ennen yhdeksättä elinviikkoa. Käytettävien eläinten paino ei saisi juurikaan vaihdella eikä ylittää ± 20:tä prosenttia kummankaan sukupuolen keskipainosta kokeen alussa. Mikäli toistuvan oraalisen annostelun tutkimusta käytetään pitkäaikaistutkimuksen esitestinä, molemmissa tutkimuksissa tulee mieluiten käyttää samasta kannasta ja lähteestä olevia eläimiä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

12. Kaikissa menettelyissä on noudatettava laboratorioeläinten hoitoa koskevia paikallisia vaatimuksia. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion valinnassa on varmistettava, että testiaineen ja ravinnon suhde on sopiva, mikäli testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna. Eläimet voidaan pitää häkeissä muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä tai yksittäin, jos se on tieteellisesti perusteltua. Yhdessä ryhmähäkissä saa olla enintään viisi eläintä.

13. Eläinten ravinto on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta. Näyte ruokavaliosta on säilytettävä siihen saakka, kunnes tutkimusraportti on valmis.

Eläinten valmistelu

14. Terveet nuoret täysikasvuiset eläimet jaetaan satunnaisesti testi- ja verrokkiryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti, ja ne pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin.

Annosten valmistelu

15. Testikemikaali annetaan ruokintaletkulla tai ruoan tai juomaveden kautta. Oraalisen annostelun menetelmä määräytyy tutkimuksen tarkoituksen sekä testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ja toksikokineettisten ominaisuuksien mukaan.

▼M4

16. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muita liuottimia. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen myrkkyominaisuudet on tunnettava. Testiaineen stabiliteetti kantaja-aineessa on määritettävä.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

17. Kutakin annostasoa tulee testata vähintään kymmenellä eläimellä (viisi naarasta ja viisi urosta). Jos osa eläimistä aiotaan lopettaa kesken kokeen, eläinten määrää tulee lisätä saman verran kuin niitä aiotaan lopettaa ennen kokeen päättymistä. Myös ylimääräisen, kymmenestä eläimestä (viisi kumpaakin sukupuolta) koostuvan satelliittiryhmän käyttöä voidaan harkita verrokkiryhmässä ja suurimman annoksen ryhmässä, jotta toksisten vaikutusten korjaantuvuutta, jatkuvuutta ja ilmenemisen viivästymistä voidaan havainnoida vähintään 14 päivän ajan käsittelyn jälkeen.

Annostelu

18. Yleensä tulee käyttää vähintään kolmea testiryhmää ja yhtä verrokkiryhmää, mutta jos vaikutuksia ei muiden tietojen arvioinnin perusteella ole odotettavissa toistetulla vuorokausiannoksella 1 000 mg/kg, voidaan tehdä raja-annostesti. Jos sopivia tietoja ei ole saatavilla, voidaan tehdä annosalueen haarukointitesti (samaa sukupuolta ja samasta lähteestä olevia eläimiä käyttäen) käytettävien annosten määrittämisen helpottamiseksi. Testiaineen annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmän eläimiä. Jos testiaineen annostelussa käytetään kantaja-ainetta, sitä tulee antaa verrokkiryhmälle suurin käytetty määrä.

19. Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon kaikki testikemikaaleista tai samankaltaisista kemikaaleista saatavilla olevat aiemmin saadut toksisuus- ja kinetiikkatiedot. Korkein annostaso tulee valita siten, että sen tarkoituksena on aiheuttaa toksisia vaikutuksia mutta ei kuolemaa tai vakavia kärsimyksiä. Annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla (NOAEL). Kaksin-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevassa annossarjassa, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin 10-kertaisia).

20. Jos havaitaan yleisiä myrkyllisyysvaikutuksia (kuten ruumiinpainon pienenemistä, maksaan, sydämeen, keuhkoihin tai munuaisiin kohdistuvia vaikutuksia jne.) tai muita muutoksia, jotka eivät ole välttämättä toksisia (esimerkiksi ravinnonoton vähentymistä, maksan suurenemista), immuunijärjestelmän, hermoston tai hormonitoiminnan kannalta herkkiin tutkittaviin ominaisuuksiin kohdistuvia vaikutuksia on tulkittava varovaisesti.

Rajatesti

21. Ellei yhdellä annostasolla, joka on vähintään 1 000 mg painokiloa kohti / vrk tai jota annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna vastaava prosenttiosuus (painomääritysten perusteella), tehdyssä testissä, joka on tehty tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, havaita myrkyllisiä vaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla kemikaaleilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Rajatestisääntöä sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

▼M4

Antotapa

22. Eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin seitsemänä päivänä viikossa 28 vuorokauden ajan. Jos testikemikaali annetaan ruokintaletkun kautta, se on annettava eläimille yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Määrä ei saa ylittää 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Poikkeuksena tästä ovat ärsyttävät tai syövyttävät aineet, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Muutoin testitilavuuden vaihtelu tulee minimoida pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla voidaan käyttää tilavuudeltaan samaa nestemäärää.

23. Jos kemikaaleja annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalimäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna, voidaan ilmoittaa joko testikemikaalin pitoisuus ravinnossa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettu annostaso; käytetty tapa on mainittava. Jos kemikaali annetaan letkulla, annos tulee antaa päivittäin samaan aikaan ja sitä on mukautettava tarvittaessa siten, että annostaso pysyy samana eläimen ruumiinpainoon nähden. Mikäli toistuvan annostelun tutkimusta käytetään pitkäaikaistutkimuksen esitestinä, kummassakin tutkimuksessa on käytettävä samanlaista ruokavaliota.

Havainnot

24. Havainnointijakson on kestettävä 28 päivää. Seurantahavainnointiin tarkoitettuja satelliittiryhmän eläimiä tulisi pitää vähintään 14 päivää ilman annostelua, jotta viivästyneet toksiset vaikutukset, niiden jatkuminen tai niistä toipuminen voidaan todeta.

25. Eläimestä on tehtävä kliinisiä yleishavaintoja vähintään kerran päivässä mieluiten suurin piirtein samaan aikaan / samoihin aikoihin joka päivä ja ottaen huomioon, että odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen. Eläinten vointi on kirjattava. Eläinten sairastavuus ja kuolleisuus tarkistetaan vähintään kahdesti päivässä.

26. Kutakin eläintä on havainnoitava kliinisesti seikkaperäisesti kerran ennen ensimmäistä altistuskertaa (samaa koe-eläintä koskevia vertailuja varten) ja sen jälkeen vähintään kerran viikossa. Havainnot tulee tehdä eläimen oman häkin ulkopuolella vakioalueella mieluiten samaan kellonaikaan joka kerta. Havainnot on kirjattava tarkoin muistiin, mieluiten koelaboratorion erikseen määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä käyttäen. Vaihtelut koeolosuhteissa on pyrittävä minimoimaan ja havainnoijien on mieluiten oltava annostelusta tietämättömiä henkilöitä. Huomiota tulee kiinnittää mm. ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, mahdollisten sisäeritteiden ja kuonaeritteiden ja autonomisen toiminnan (esim. kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, hengitys) muutoksiin. Käynnin, asennon ja käsittelyvasteen muutokset, mahdolliset klooniset tai tooniset liikkeet, stereotypiat (esim. ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esim. itsensä silpominen, takaperin käveleminen) tulee myös kirjata muistiin (2).

27. Neljännellä altistusviikolla arvioidaan aistien reaktiivisuutta erityyppisille ärsykkeille (2) (esim. kuulo, näkö ja asentotunto) (3) (4) (5), tarttumaotteen voimakkuutta (6) ja motorista toimintaa (7). Mahdollisten toimenpiteiden tarkemmat yksityiskohdat löytyvät mainituista kirjallisuusviitteistä. Myös muita kuin viittausten mukaisia toimenpiteitä voidaan käyttää.

▼M4

28. Toiminnallisia havaintoja ei tarvitse tehdä neljännellä altistusviikolla, jos kyseessä on subkroonisen (90 päivän) tutkimuksen esitutkimus. Tällöin toiminnalliset havainnot tehdään seurantatutkimuksessa. Toisaalta toistuvan annostelun tutkimuksesta saatavat toiminnallisia havaintoja koskevat tiedot voivat helpottaa annostasojen valintaa subkroonista tutkimusta varten.

29. Poikkeuksellisesti toiminnallisia havaintoja ei myöskään tarvitse tehdä ryhmillä, joissa muutoin ilmenee merkkejä myrkyllisyydestä laajuudessa, joka häiritsisi merkitsevästi toiminnallisten kokeiden suorittamista.

30. Ruumiinavauksen yhteydessä kaikkien naaraiden kiimasykli voidaan määrittää (valinnaisesti) ottamalla niiltä irtosolunäytteet. Näistä havainnoista saadaan tietoa kiimasyklin vaiheesta eläimen lopettamisen ajankohtana, ja niistä on myös apua estrogeeniherkkien kudosten histologisessa arvioinnissa [katso histopatologiaa koskevat ohjeet (19)].

Ruumiinpaino ja ravinnon/veden kulutus

31. Kukin eläin on punnittava vähintään kerran viikossa. Ravinnon kulutus on mitattava vähintään viikoittain. Jos testikemikaali annostellaan juomavedessä, myös veden kulutus on mitattava vähintään viikoittain.

Hematologia

32. Seuraavat verikokeet on tehtävä koejakson päätyttyä: hematokriitti, hemoglobiini, erytrosyyttien määrä, retikulosyytit, leukosyyttien kokonaismäärä ja erittelylaskenta, trombosyyttien määrä ja veren hyytymisajan/-potentiaalin mittaus. Muita määrityksiä, jotka on tehtävä, jos testikemikaalilla tai sen oletetuilla metaboliiteilla on tai epäillään olevan hapettavia ominaisuuksia, ovat methemoglobiinipitoisuus ja Heinzin kappaleet.

33. Verinäytteet tulee ottaa nimetystä kohdasta juuri ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Näytteet tulee säilyttää asianmukaisissa olosuhteissa. Eläinten ruokintaa on siirrettävä lopettamista edeltävän yön yli ([1]).

Kliininen biokemia

34. Kliiniset biokemialliset määritykset tärkeimpien toksisten kudosvaikutusten ja erityisesti munuais- ja maksavaikutusten tutkimiseksi tulee tehdä verinäytteistä, jotka otetaan kustakin eläimestä juuri ennen lopettamista tai sen yhteydessä (lukuun ottamatta eläimiä, jotka on löydetty kuolemaisillaan ja/tai lopetettu kesken kokeen). Plasma- ja seerumikokeiden tulee kattaa natrium, kalium, glukoosi, kokonaiskolesteroli, urea, kreatiniini, kokonaisproteiini ja albumiini, vähintään kaksi hepatosellulaarisia vaikutuksia osoittavaa entsyymiä (kuten alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, alkalinen fosfataasi, gammaglutamyylitranspeptidaasi ja glutamaattidehydrotenaasi) ja sappihapot. Muiden entsyymien (maksasta tai muualta peräisin olevien) ja bilirubiinin mittauksista voidaan saada hyödyllistä tietoa tietyissä olosuhteissa.

35. Vaihtoehtoisesti voidaan tehdä seuraavat virtsa-analyysit viimeisellä tutkimusviikolla ajastetun virtsankeräyksen avulla: ulkonäkö, määrä, osmolaliteetti tai ominaistiheys, pH-arvo, proteiini, glukoosi ja veri/verisolut.

([1]) Ruokinnan siirtämistä yön yli suositellaan monissa seerumi- ja plasmamittauksissa, etenkin glukoosimittauksissa. Tärkein syy tälle suositukselle on se, että syöminen väistämättä lisää vaihtelua, mikä voi estää lievien vaikutusten havaitsemisen ja vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Toisaalta ruokinnan siirtäminen yön yli voi häiritä eläinten yleistä metaboliaa ja etenkin ruokintatutkimuksissa päivittäistä altistusta testikemikaalille. Jos eläimen ruokinta siirretään yli yön, kliiniset biokemialliset mittaukset tulee tehdä neljännellä tutkimusviikolla suoritettavien toiminnallisten havaintojen jälkeen.

▼M4

36. Lisäksi tulee tutkia, esiintyykö seerumissa yleisiä kudosvaurioita osoittavia merkkiaineita. Muita määrityksiä, jotka on tehtävä, jos testikemikaalin tunnetut ominaisuudet voivat vaikuttaa tai niiden epäillään vaikuttavan siihen liittyviin metaboliaprofiileihin, ovat kalsium, fosfaatti, triglyseridit, tietyt hormonit, methemoglobiini ja koliiniesteraasi. Nämä on selvitettävä tiettyjen luokkien aineista tai tapauskohtaisesti.

37. Vaikka hormonitoimintaan liittyvien tutkittavien ominaisuuksien kansainvälisessä arvioinnissa ei voitu osoittaa, että kilpirauhashormonien (T3, T4) ja TSH:n määrittämisestä olisi selvää hyötyä, plasma- ja seeruminäytteet kannattaa kuitenkin säilyttää T3- ja T4-arvojen sekä TSH-arvon (valinnainen) mittaamista varten, jos näyttää siltä, että kemikaali vaikuttaa aivolisäke-kilpirauhasakseliin. Nämä näytteet voidaan pakastaa –20 °C:ssa säilytystä varten. Seuraavat seikat saattavat vaikuttaa hormonimääritysten vaihteluun ja absoluuttisiin pitoisuuksiin:

— lopettamisaika hormonipitoisuuksien vuorokausivaihtelun takia

— lopettamistapa, jotta vältetään aiheuttamasta eläimille turhaa stressiä, joka voi vaikuttaa hormonipitoisuuksiin

— hormonimääritysten testipaketit, joiden standardikäyrät voivat vaihdella.

Kilpirauhaseen vaikuttavat kemikaalit tunnistetaan varmemmin ja luotettavammin käyttämällä hormonipitoisuuksien sijasta mieluummin histopatologista analyysia.

38. Plasmanäytteet, jotka on nimenomaisesti tarkoitettu hormonimäärityksiin, on otettava samaan aikaan päivästä. On suositeltavaa harkita T3-, T4- ja THS-määrityksiä, jos kilpirauhasen histopatologiset muutokset antavat siihen aihetta. Hormonipitoisuuksien analysoimisesta saadaan toisenlaisia numeerisia arvoja kuin erilaisten kaupallisten testipakettien avulla. Näin ollen yhtenäisiin aiempiin tietoihin perustuvia vaatimuksia ei voida välttämättä laatia. Vaihtoehtoisesti laboratorioiden on pyrittävä pitämään variaatiokertoimet T3:n ja T4:n osalta pienempinä kuin 25 ja TSH:n osalta pienempänä kuin 35. Kaikki pitoisuudet on kirjattava käyttäen yksikköä ng/ml.

39. Jos aiemmat lähtötason tiedot ovat riittämättömiä, hematologiset ja kliiniset biokemialliset muuttujat on määritettävä ennen annostelun aloittamista tai mieluiten ryhmässä eläimiä, jotka eivät kuulu koeryhmiin.

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

40. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Kaikkien eläinten (lukuun ottamatta kuolleina löydettyjä ja/tai kesken koetta lopetettuja) maksa, munuaiset, lisämunuaiset, kivekset, lisäkivekset, eturauhanen + rakkularauhanen ja niiden etuosat kokonaisuudessaan, kateenkorva, perna, aivot ja sydän on puhdistettava muusta kudoksesta tapauksen mukaan, ja ne on punnittava mahdollisimman nopeasti avauksen jälkeen kuivumisen estämiseksi. Eturauhaskokonaisuuden puhdistamisessa on oltava huolellinen, jotta nestettä sisältävät rakkularauhaset eivät puhkea. Rakkularauhaset ja eturauhanen voidaan puhdistaa ja punnita myös kiinnittämisen jälkeen.

▼M4

41. Lisäksi voidaan valinnaisesti punnita kaksi muuta kudosta mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi: munasarjat (märkäpaino), kohtu ja kohdunkaula (ohjeita kohtukudosten irrottamisesta ja valmistelusta punnitusta varten on OECD:n ohjeessa TG 440 (18)).

42. Kilpirauhasen paino (valinnainen) voidaan määrittää kiinnittämisen jälkeen. Puhdistus on tehtävä hyvin varovasti ja vasta kiinnittämisen jälkeen kudosvaurioiden välttämiseksi. Kudosvauriot voivat haitata histopatologista analyysia.

43. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (katso 47 kohta): kaikki silmin havaittavat vauriot, aivot (edustavat alueet, mukaan lukien iso- ja pikkuaivot ja aivosilta), selkäydin, mahalaukku, ohutsuoli, paksusuoli (mukaan lukien Peyerin levyt), maksa, munuaiset, lisämunuaiset, perna, sydän, kateenkorva, kilpirauhanen, henkitorvi ja keuhkot (säilytetään puhaltamalla keuhkot täyteen kiinnitysainetta ja upottamalla ne sitten kiinnitysaineeseen), sukurauhaset (kivekset ja munasarjat), avustavat sukuelimet (kohtu ja kohdunkaula, lisäkivekset, eturauhanen ja rakkularauhanen sekä niiden etuosat), vagina, virtsarakko, imusolmukkeet [proksimaalisimman imusolmukkeen lisäksi on otettava vielä toinen imusolmuke laboratorion kokemuksen perusteella (15)], ääreishermo (lonkka- tai säärihermo) mieluiten läheltä lihasta, luurankolihas ja luu sekä osa luuydintä (tai vaihtoehtoisesti tuore luuydinaspiraatti). Kivekset suositellaan kiinnitettävän upottamalla ne Bouinin tai muunneltuun Davidsonin kiinnitysaineeseen (16) (17). Tunica albugineaan on tehtävä varovasti pieni reikä neulalla elimen molempiin päihin, jotta kiinnitysaine pääsee tunkeutumaan sisään nopeasti. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköiset kohde-elimet on säilytettävä.

44. Seuraavista kudoksista voi löytyä tärkeitä merkkejä hormonitoimintaan liittyvistä vaikutuksista: sukurauhaset (munasarjat ja kivekset), avustavat sukuelimet (kohtu ja kohdunkaula, lisäkivekset, rakkularauhanen ja sen etuosa, dorsolateraalinen ja ventraalinen eturauhanen), vagina, aivolisäke, uroksen rintarauhanen sekä kilpirauhanen ja lisämunuainen. Uroksen rintarauhasten muutoksia ei ole dokumentoitu riittävästi, mutta tämä parametri voi olla hyvin herkkä aineille, joilla on estrogeenisia vaikutuksia. Niiden elinten/kudosten, joita ei ole lueteltu 43 kohdassa, havainnointi ei ole pakollista (katso lisäys 2).

45. Histopatologiaa koskevissa ohjeissa (19) on tarkempia tietoja endokriinisten kudosten dissektiosta, kiinnittämisestä, mikrotomiasta ja histopatologiasta.

46. Kansainvälisestä testiohjelmasta saatiin jonkin verran näyttöä siitä, että sellaisten kemikaalien, jotka vaikuttavat sukupuolihormonien tasapainoon vain vähän, lievät hormonitoimintaan kohdistuvat vaikutukset voidaan tunnistaa kiimasyklin synkronoinnin häiriintymisestä eri kudoksissa eikä niinkään suoraan naaraan sukupuolielinten histopatologisista muutoksista. Vaikkei tällaisista vaikutuksista saatu varmoja todisteita, on suositeltavaa ottaa huomioon todisteet kiimasyklin epäsynkroniasta, kun tulkitaan munasarjojen (follikkeli-, teeka- ja granuloosasolut), kohdun, kohdunkaulan ja vaginan histopatologiaa. Jos syklin vaihe on arvioitu vaginan irtosolunäytteestä, myös tämä tieto voidaan sisällyttää tähän vertailuun.

▼M4

Histopatologia

47. Kaikkien verrokkien ja suuriannoksiseen ryhmään kuuluneiden eläinten säilytetyt elimet ja kudokset tutkitaan perusteellisesti histopatologisesti. Histopatologiset tutkimukset tulee tehdä myös kaikille muiden annostusryhmien eläimille, jos käsittelyyn liittyviä muutoksia havaitaan suuren annoksen ryhmässä.

48. Kaikki silmin havaittavat vauriot on tutkittava.

49. Mahdolliseen satelliittiryhmään kuuluvilta eläimiltä tulee tutkia histopatologisesti sellaiset kudokset ja elimet, joissa ilmenee samoja vaikutuksia kuin käsitellyillä ryhmillä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

50. Koetulokset tulee esittää yksilöidysti. Yhteenveto tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin koeryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, merkkejä myrkyllisyydestä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen toksisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin.

51. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Verrattaessa vaikutusta pitoisuusalueen mukaan on vältettävä monien t-testien käyttöä. Tilastolliset menetelmät tulee valita tutkimusasetelman suunnitteluvaiheessa.

52. Laadunvalvontaa varten on suositeltavaa kerätä vertailutietoja aiemmista tutkimuksista ja laskea vaihtelukertoimista numeeriset tiedot varsinkin sellaisista parametreista, jotka liittyvät hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemiseen. Näitä tietoja voidaan käyttää vertailutarkoituksiin, kun varsinaisia tutkimuksia arvioidaan.

Testiraportti

53. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty laji/kanta

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa

— lajin valinnan perustelut, jos se on muu kuin rotta.

Testiolosuhteet:

— annostason valintaperustelut

— yksityiskohdat testikemikaalin koostumuksesta/ravintovalmisteesta, valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta, sen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

▼**M4**

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— ravinnossa/juomavedessä olevan testikemikaalin määrän (ppm) muuntaminen varsinaiseksi annokseksi (mg/kg/vrk) tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Valinnaiset tutkitut ominaisuudet

— luettelo valinnaisista ominaisuuksista, jotka on tutkittu.

Tulokset:

— ruumiinpaino / ruumiinpainon muutokset

— ravinnon ja tarvittaessa veden kulutus

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, mukaan lukien toksisuusoireet

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta)

— arvioinnit aistitoiminnoista, tarttumaotteen voimakkuudesta ja motorisesta toiminnasta

— verikokeet ja niihin liittyvät lähtötasoarvot

— kliiniset biokemialliset kokeet ja niihin liittyvät lähtötasoarvot

— ruumiinpaino eläimen lopettamisen yhteydessä ja eri elinten painotiedot

— ruumiinavauslöydökset

— kaikkien histopatologisten löydösten seikkaperäinen kuvaus

— tiedot imeytymisestä, mikäli saatavilla

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

▼M4

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Androgeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) tavoin.

Annos on annetun testikemikaalin määrä. Annos ilmaistaan testikemikaalin painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esim. mg/kg päivässä) tai vakioina pidettävinä ruokavalion pitoisuuksina (ppm).

Annostelu on yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutaajuuden ja annostelun keston.

Antiandrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Antiestrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Estrogeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) tavoin.

Ilmeinen toksisuus on yleistermi, jolla tarkoitetaan testikemikaalin antamisen jälkeen ilmeneviä selviä toksisuuden oireita. Niitä on oltava riittävästi vaaran arviointia varten, ja niiden on oltava sellaisia, että annetun annoksen suurentamisen voidaan odottaa aiheuttavan vakavia merkkejä myrkyllisyydestä ja todennäköisesti kuolleisuutta.

Kilpirauhasen kaltainen vaikutus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) tavoin.

Kilpirauhasen toimintaa estävä vaikutus on kemikaalin kyky estää luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

NOAEL on lyhennys englanninkielisistä sanoista no-observed-adverse-effect level (taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta). Se on siis suurin annos, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Validointi on tieteellinen menettely, jonka tarkoituksena on luonnehtia testimenetelmän toiminnallisia vaatimuksia ja rajoituksia sekä osoittaa sen luotettavuus ja merkityksellisyys tiettyyn tarkoitukseen nähden.

▼M4

Lisäys 2

Testimenetelmässä B.7 tutkittavat ominaisuudet hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemiseksi

Pakolliset tutkittavat kohteet	Valinnaiset tutkittavat kohteet
Paino	
— Kivekset — Lisäkivekset — Lisämunuaiset — Eturauhanen + rakkularauhanen ja niiden etuosat	— Munasarja — Kohtu ja kohdunkaula — Kilpirauhanen
Histopatologia	
— Sukupuolirauhaset: — Kivekset — Munasarjat — Lisäsukupuolirauhaset: — Lisäkivekset — Eturauhanen + rakkularauhanen ja niiden etuosat — Kohtu ja kohdunkaula — Lisämunuaiset — Kilpirauhanen — Vagina	— Vaginan irtosolunäytteet — Urosten maitorauhaset — Aivolisäke
Hormonimääritys	
	— T3- ja T4-hormonien pitoisuus verenkierrossa — TSH-hormonin pitoisuus verenkierrossa

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the *ad hoc* Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60,

3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691–704.

5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

▼M4

7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

11) OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404–407.

16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, s. 52–85.

17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524–533.

18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8 SUBAKUUTTI MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ: 28 PÄIVÄN TUTKIMUS

TIIVISTELMÄ

Tämän tarkistetun testimenetelmän B.8 tarkoituksena on luonnehtia kokonaisvaltaisesti testikemikaalin myrkyllisyyttä hengitettynä toistuvan altistuksen jälkeen tietyllä ajanjaksolla (28 päivää) ja tuottaa tietoa määrällistä riskinarviointia varten. Jyrsijäryhmät, joissa on vähintään viisi urosta ja viisi naarasta, altistetaan kuuden tunnin ajan päivittäin 28 päivän ajan a) testikemikaalille kolmella tai useammalla pitoisuudella, b) suodatetulle ilmalle (negatiivinen kontrolli) ja/tai kantaja-aineelle (kantaja-ainekontrolli). Eläimiä altistetaan yleensä viitenä päivänä viikossa, mutta myös seitsemän päivän altistus viikossa on mahdollista. Sekä uroksia että naaraita testataan aina, mutta ne voidaan altistaa eri pitoisuuksille, jos jommankumman tiedetään olevan herkempi tietylle testikemikaalille. Tässä menetelmässä tutkimuksen johtajalla on mahdollisuus sisällyttää tutkimukseen satelliittiryhmiä (vaikutusten korjaantuvuus), bronkoalveolaarinen huuhtelu (BAL), neurologisia testejä sekä muita kliiniskemiallisia ja histopatologisia arviointeja, jotta testikemikaalin myrkyllisyyttä voidaan luonnehtia paremmin.

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 412 (2009). Alkuperäinen subakuuttia inhalaatiotestiä koskeva testiohje nro 412 (TG 412) hyväksyttiin vuonna 1981. Tätä testimenetelmää B.8 (joka vastaa tarkistettua ohjetta TG 412) on ajantasaistettu, jotta tieteellinen kehitys voidaan ottaa huomioon ja jotta nykyiset ja tulevat sääntelyvaatimukset voidaan täyttää.

2. Tämän menetelmän avulla voidaan luonnehtia haittavaikutuksia, joita seuraa toistuvasta altistumisesta testikemikaalille päivittäin hengityksen kautta 28 päivän ajan. Tietoja, jotka saadaan 28 päivän mittaisista, subakuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevista tutkimuksista, voidaan käyttää määrällisissä riskinarvioinneissa [jos niiden jälkeen ei tehdä 90 päivän tutkimusta subkroonisesta myrkyllisyydestä hengitettynä (tämän liitteen luku B.29)]. Tiedoista voi olla apua myös valittaessa pitoisuuksia pitkäkestoisempiin tutkimuksiin, kuten 90 päivän tutkimukseen, jossa tarkastellaan subkroonista myrkyllisyyttä hengitettynä. Tätä testimenetelmää ei ole varsinaisesti tarkoitettu nanomateriaalien testaamiseen. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät ovat tämän luvun lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

ALUSTAVAT HUOMIOT

3. Testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista tutkimuksen laadun parantamiseksi ja eläinten käytön minimoimiseksi. Tietoihin, joista voi olla apua asianmukaisten testipitoisuuksien valinnassa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -toksisuustestien tulokset, odotettavissa olevat käytöt ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista sekä akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevista testeistä saadut tulokset. Jos oletetaan tai havaitaan, että tutkimuksen aikana ilmenee neurotoksisuutta, tutkimuksen johtaja voi sisällyttää tutkimukseen asianmukaisia arviointeja, kuten toiminnallisen havaintosarjan (FOB:n) ja motorisen aktiivisuuden mittauksen. Vaikka altistuksen ajoitus voi olla kriittinen tietyissä tutkimuksissa, näiden ylimääräisten toimien toteuttaminen ei saa häiritä perustutkimuksen rakennetta.

▼M4

4. Syövyttävien tai ärsyttävien testikemikaalien laimennoksia voidaan testata sellaisina pitoisuuksina, joilla saadaan aikaan haluttu myrkyllisyyden aste [katso GD 39 (2)]. Kun eläimiä altistetaan näille materiaaleille, tavoitepitoisuuksien on oltava riittävän pienet, jotta eläimille ei aiheudu suurta kipua ja stressiä, mutta kuitenkin tarpeeksi suuret, jotta pitoisuus-vastekäyrä on riittävä sääntelyyn liittyvien ja tieteellisten testaustavoitteiden saavuttamiseksi. Nämä pitoisuudet on valittava tapauskohtaisesti, ja niiden tulee ensisijaisesti perustua asianmukaisesti suunniteltuun annosalueen määritystestiin, josta saadaan tietoa kriittisestä tutkittavasta ominaisuudesta, ärsytysrajasta ja oireiden alkamisajankohdasta (katso 11–13 kohta). Pitoisuuden valinnalle on esitettävä perusteet.

5. Kuolemaisillaan olevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti. Kuolemaisillaan olevia eläimiä käsitellään samalla tavalla kuin eläimiä, jotka kuolevat testissä. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (3) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

6. Kokeessa tulee käyttää terveitä nuoria täysikasvuisia jyrsijöitä, jotka kuuluvat yleisesti käytettyihin koe-eläinkantoihin. Suositeltavin laji on rotta. Jos käytetään muita lajeja, sille on esitettävä perustelut.

Eläinten valmistelu

7. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Satunnaistamispäivänä eläinten on oltava nuoria ja täysikasvuisia, ja niiden iän on oltava 7–9 viikkoa. Ruumiinpainon on oltava ± 20 prosenttia keskimääräisestä painosta kummankin sukupuolen osalta. Eläimet valitaan satunnaistetusti ja merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan. Eläimet pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin.

Eläinten hoito

8. Eläimet on voitava erottaa toisistaan esimerkiksi ihon alle asennettavien lähettimien avulla havainnoinnin helpottamiseksi ja sekaannuksien välttämiseksi. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suhteellinen ilmankosteus on pidettävä mielellään 30–70 prosentin välillä, mikä ei välttämättä ole mahdollista, jos kantaja-aineena käytetään vettä. Ennen altistuksia ja niiden jälkeen eläimet on eroteltava häkkeihin sukupuolen ja pitoisuuden mukaisiin ryhmiin, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia, ja määrä on pidettävä sellaisena, että kannibalismista ja tappelusta johtuvat hävikit voidaan minimoida. Jos eläimet altistetaan vain nasaalisesti, ne voi olla tarpeen totuttaa immobilisointiputkiin. Immobilisointiputket eivät saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta fyysistä, lämpöön tai liikkumattomuuteen liittyvää stressiä. Immobilisointi voi vaikuttaa fysiologisiin tutkittaviin ominaisuuksiin, kuten ruumiinlämpöön (hypertermia) ja/tai hengityksen minuuttitilavuuteen. Jos saatavilla on rinnakkaistietoja, jotka osoittavat, ettei tällaisia muutoksia juuri ilmene, immobilisointiputkiin totuttaminen ei ole tarpeen. Eläimet, jotka altistetaan aerosolille kokonaan, on laitettava kokeen ajaksi häkkiin yksittäin, jotta testattava aerosoli ei suodatu muiden häkissä olevien eläinten karvapeitteen kautta. Tavallista ja sertifioitua laboratorioruokavaliota voidaan käyttää muulloin paitsi altistuksen aikana, eikä tavallisen juomaveden määrää tule rajoittaa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää).

▼M4

Inhalaatiokammiot

9. Testikemikaalin luonne ja testin tavoite on otettava huomioon inhalaatiokammiota valittaessa. Ensisijainen altistustapa on vain nasaalisesti (nose-only; tähän termiin kuuluvat altistustavat vain pään kautta, vain nasaalisesti tai vain nokan kautta). Vain nasaalista altistusta suositellaan yleensä tutkittaessa nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja sekä sellaisia höyryjä, jotka saattavat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Tutkimuksen tietyt tavoitteet voidaan saavuttaa paremmin käyttämällä koko kehoon kohdistuvaa altistusta, mutta se on perusteltava tutkimusraportissa. Jotta kammion ilma voidaan pitää vakaana koko kehon kammiossa, koe-eläinten viemä tila saa olla korkeintaan viisi prosenttia kammion tilavuudesta. Vain nasaalisesti -altistuksen ja koko kehoon kohdistuvan altistuksen tekniikoiden periaatteet sekä niiden erityiset hyödyt ja haitat on kuvattu ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

MYRKYLLISYYSTUTKIMUKSET

Rajapitoisuudet

10. Toisin kuin akuuteissa tutkimuksissa, 28 päivän subakuuteissa tutkimuksissa, joissa tarkastellaan myrkyllisyyttä hengitettynä, ei ole määritettyjä rajapitoisuuksia. Testatun enimmäispitoisuuden osalta on otettava huomioon seuraavat seikat: 1) suurin mahdollinen pitoisuus, 2) ihmisen altistustaso pahimmassa tapauksessa, 3) tarve ylläpitää riittävä hapensyöttö ja/tai 4) eläinten hyvinvointiin liittyvät seikat. Koska tietoon perustuvia rajoja ei siis ole, voidaan käyttää asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (13) mukaisia akuutteja rajoja (ts. enimmäispitoisuus aerosolien osalta on 5 mg/l, höyryjen osalta 20 mg/l ja kaasujen osalta 20 000 ppm), ks. GD 39 (2). Jos nämä rajat täytyy ylittää esimerkiksi testattaessa kaasuja tai erittäin haihtuvia testikemikaaleja (esimerkiksi jäähdytysaineita), sille on esitettävä perustelut. Rajapitoisuudella on saatava aikaan selvä myrkyllisyys, joka ei saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta stressiä tai vaikuttaa niiden pitkäikäisyyteen (3).

Annosalueen määritystutkimus

11. Ennen päätutkimuksen aloittamista voi olla tarpeen tehdä annosalueen määritystutkimus. Annosalueen määritystutkimus on esikoetta kattavampi, koska sitä ei ole rajattu pitoisuuden valintaan. Annosalueen määritystutkimuksesta karttunut tieto voi edistää päätutkimuksen onnistumista. Annosalueen määritystutkimuksesta voidaan saada esimerkiksi teknistä tietoa analyysimenetelmistä, hiukkasten koosta, toksisten mekanismien löytämisestä, kliinisestä patologiasta ja histopatologiasta, ja sen avulla voidaan arvioida, mitkä ovat päätutkimuksen NOAEL- ja MTC-pitoisuudet. Tutkimuksen johtaja voi päättää toteuttaa annosalueen määritystutkimuksen, jotta tiedetään, mikä on hengityselimistöä ärsyttävä pitoisuus (esimerkiksi hengityselimistön histopatologia, keuhkojen toiminnan testaus tai bronkoalveolaarinen huuhtelu), mikä on siedettävän pitoisuuden yläraja, joka ei aiheuta eläimille tarpeetonta stressiä, ja millä parametreilla testikemikaalin myrkyllisyyttä voidaan luonnehtia parhaiten.

12. Annosalueen määritystutkimuksessa voi olla yksi tai useampi pitoisuustaso. Kullekin pitoisuustasolle saa altistaa enintään kolme urosta ja kolme naarasta. Annosalueen määritystutkimuksen on kestettävä vähintään viisi päivää, yleensä ei enempää kuin 14 päivää. Tutkimusraportissa on esitettävä perustelut päätutkimuksen pitoisuuksien valinnalle. Päätutkimuksen tavoite on osoittaa sellainen pitoisuus-vastesuhde, joka perustuu herkimmäksi oletettuun tutkittavaan ominaisuuteen. Pienen pitoisuuden on mielellään oltava sellainen, joka ei aiheuta havaittavia haittavaikutuksia, kun taas suuren pitoisuuden on aiheutettava selvä myrkyllisyys, joka ei kuitenkaan saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta stressiä tai vaikuttaa niiden pitkäikäisyyteen (3).

▼M4

13. Kun valitaan annosalueen määritystutkimuksen pitoisuustasoja, on käytettävä kaikkea saatavilla olevaa tietoa, myös rakenne-aktiivisuussuhdetta koskevia tietoja ja samanlaisia kemikaaleja koskevia tietoja (katso 3 kohta). Annosalueen määritystutkimuksessa voidaan vahvistaa tai kumota se, mitä pidetään herkimpänä mekanistisesti perusteltuna tutkittavana ominaisuutena, esimerkiksi koliiniesteraasin esto organofosfaateilla, methemoglobiinin muodostus erytrosytotoksisilla aineilla, kilpirauhashormonit (T_3, T_4) kilpirauhaselle myrkyllisillä aineilla sekä proteiini, LDH tai neutrofiilit bronkoalveolaarisessa huuhtelussa vaarattomilla huonosti liukenevilla hiukkasilla tai keuhkoja ärsyttävillä aerosoleilla.

Päätutkimus

14. Subakuuttia myrkyllisyyttä koskeva päätutkimus sisältää yleensä kolme pitoisuustasoa ja tarvittaessa myös samanaikaiset negatiivisen (ilma)verrokkiryhmän ja/tai kantaja-aineverrokkiryhmän (katso 17 kohta). Asianmukaisten altistustasojen valinnassa on käytettävä apuna kaikkia saatavilla olevia tietoja, mukaan luettuina tulokset systeemisistä myrkyllisyystutkimuksista sekä metabolia ja kinetiikka (erityisesti on pyrittävä välttämään suuria pitoisuuksia, joiden vuoksi kineettiset prosessit saturoituvat). Jokainen testiryhmä sisältää vähintään 10 jyrsijää (viisi urosta ja viisi naarasta), jotka altistetaan testikemikaalille kuuden tunnin ajaksi päivittäin viitenä päivänä viikossa neljän viikon ajanjaksolla (tutkimuksen kokonaiskesto on 28 päivää). Eläimet voidaan altistaa myös seitsemänä päivänä viikossa (esimerkiksi testattaessa inhaloitavia lääkkeitä). Jos jommankumman sukupuolen tiedetään olevan herkempi tietylle testikemikaalille, sukupuolet voidaan altistaa eri pitoisuuksille pitoisuus-vasteen optimoimiseksi 15 kohdassa kuvatun mukaisesti. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoja voidaan mukauttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Perustelut on esitettävä, jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä tai jos on toteutettava pitkäkestoinen (esimerkiksi 22 tuntia/päivä) koko kehoon kohdistuvan altistuksen tutkimus [katso GD 39 (2)]. Eläimiä ei saa ruokkia altistusjakson aikana, paitsi jos altistus kestää yli kuusi tuntia. Vettä saa antaa koko kehoon kohdistuvan altistuksen ajan.

15. Valituilla tavoitepitoisuuksilla tulee voida tunnistaa kohde-elin (-elimet) ja osoittaa selvä pitoisuus-vaste:

— Suurimman pitoisuuden tulee aiheuttaa myrkyllisiä vaikutuksia, mutta ne eivät saa lievittyä tai aiheuttaa kuolleisuutta, koska se estää mielekkään arvioinnin.

— Keskisuuri pitoisuus (keskisuuret pitoisuudet) on valittava siten, että myrkylliset vaikutukset porrastuvat pienimmän ja suurimman pitoisuuden välille.

— Pienimmän pitoisuuden tulee aiheuttaa vain vähän tai ei lainkaan oireita myrkyllisyydestä.

Satelliittitutkimus (vaikutusten korjaantuvuus)

16. Satelliittitutkimuksen (korjaantuvuustutkimuksen) avulla voidaan tarkkailla myrkytysoireiden korjaantuvuutta, pysyvyyttä sekä sitä, esiintyykö viivästyneitä myrkytysoireita käsittelyn jälkeisellä jaksolla, jonka on oltava riittävän pitkä, vähintään kuitenkin 14 päivää. Satelliittiryhmissä (korjaantuvuusryhmissä) on viisi urosta ja viisi naarasta, jotka altistetaan samaan aikaan kuin päätutkimuksen koe-eläimet. Satelliittitutkimuksen (korjaantuvuustutkimuksen) ryhmät on altistettava testikemikaalille suurimmalla pitoisuudella, ja tarvittaessa tutkimuksissa on oltava rinnakkaiset ilma- ja/tai kantaja-aineverrokit (katso 17 kohta).

▼M4

Verrokkieläimet

17. Rinnakkaisryhmien negatiivisia (ilma)verrokkieläimiä on käsiteltävä samalla tavalla kuin testiryhmän eläimiä muutoin paitsi että ne altistetaan suodatetulle ilmalle testikemikaalin sijasta. Jos testi-ilmakehän tuottamisessa käytetään apuna vettä tai muuta ainetta, tutkimukseen on sisällytettävä kantaja-aineverrokkiryhmä negatiivisen (ilma)verrokkiryhmän sijasta. Kantaja-aineena on käytettävä vettä, mikäli mahdollista. Jos kantaja-aineena käytetään vettä, verrokkieläimet on altistettava ilmalle, jonka suhteellinen kosteus on sama kuin altistusryhmissä. Sopiva kantaja-aine on valittava asianmukaisesti toteutetun esitutkimuksen tai aiempien tietojen pohjalta. Jos kantaja-aineen myrkyllisyyttä ei tiedetä, tutkimuksen johtaja voi päättää käyttää sekä negatiivista (ilma)verrokkiryhmää ja kantaja-aineverrokkiryhmää, joskaan se ei ole suositeltavaa. Jos aiemmat tiedot osoittavat, että kantaja-aine on myrkytön, negatiivista (ilma)verrokkiryhmää ei tarvita, ja tällöin tulee käyttää vain kantaja-aineverrokkia. Jos esitutkimus osoittaa, ettei kantaja-aineessa oleva testikemikaali ole myrkyllinen, se tarkoittaa sitä, että kantaja-aine on myrkytön testatulla pitoisuudella, ja tällöin on käytettävä tätä kantaja-aineverrokkia.

ALTISTUSOLOSUHTEET

Pitoisuuksien annostelu

18. Eläimet altistetaan testikemikaalille, kun se on kaasuna, höyrynä, aerosolina tai niiden sekoituksena. Testattava fyysinen olomuoto määräytyy testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, valitun pitoisuuden ja/tai testikemikaalin käsittelyssä ja käytössä todennäköisen fyysisen muodon perusteella. Hygroskooppiset ja kemiallisesti reaktiiviset testikemikaalit on testattava kuivaa ilmaa käyttäen. Räjähtävien pitoisuuksien tuottamista on vältettävä huolellisesti. Hiukkasmateriaaleja voidaan joutua käsittelemään mekaanisesti hiukkaskoon pienentämisen vuoksi. Lisätietoja on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Hiukkaskokojakauma

19. Hiukkasten koko on mitattava kaikista aerosoleista ja sellaisista höyryistä, jotka voivat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Jotta kaikki hengityselimistön oleelliset osat altistuvat aineelle, on suositeltavaa käyttää aerosoleja, joiden massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) on 1–3 μm ja joiden geometrinen keskihajonta (σ_g) sijoittuu välille 1,5–3,0 (4). Tämä vaatimus on pyrittävä täyttämään kaikin keinoin, mutta jos se ei onnistu, on esitettävä asiantuntijan lausunto. Esimerkiksi metallihuurut voivat olla tätä vaatimusta pienempiä, kun taas varautuneet hiukkaset ja kuidut voivat olla vaatimusta suurempia.

Testikemikaalin valmistelu kantaja-aineessa

20. Testikemikaali on testattava mielellään ilman kantaja-ainetta. Jos kantaja-aineen käyttö on tarpeellista asianmukaisen testikemikaalipitoisuuden ja hiukkaskoon tuottamiseksi, on käytettävä ensisijaisesti vettä. Aina kun testikemikaali liuotetaan kantaja-aineeseen, sen stabiilius on osoitettava.

ALTISTUSOLOSUHTEIDEN SEURANTA

Kammion ilmavirtaus

21. Ilman virtausta altistuskammion läpi on valvottava tarkasti ja seurattava jatkuvasti, ja sitä koskevat tiedot on kirjattava vähintään kerran tunnissa jokaisen altistuksen aikana. Testi-ilmakehän pitoisuuden (tai ajallisen stabiiliuden) reaaliaikainen seuranta kuuluu olennaisena osana kaikkien dynaamisten parametrien mittaamiseen, ja se on myös epäsuora keino valvoa kaikkia oleellisia dynaamisia inhalaatioparametreja. Jos pitoisuutta seurataan reaaliajassa, ilmavirtausten mittaustaajuutta voidaan vähentää yhteen mittaukseen altistusta kohti päivässä. Erityistä huomiota on kiinnitettävä siihen,

▼M4

että uudelleenhengittäminen vältetään vain nasaalisesti -altistuksen kammioissa. Happipitoisuuden on oltava vähintään 19 prosenttia, eikä hiilidioksidipitoisuus saa ylittää yhtä prosenttia. Jos on aihetta olettaa, ettei näitä vaatimuksia voida täyttää, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet on mitattava. Jos ensimmäisenä altistuspäivänä tehdyt mittaukset osoittavat, että näiden kaasujen pitoisuus on asianmukainen, myöhemmät mittaukset eivät välttämättä ole tarpeen.

Kammion lämpötila ja suhteellinen kosteus

22. Kammion lämpötila on pidettävä välillä 22 ± 3 °C. Eläinten hengitysilman suhteellista kosteutta on seurattava sekä nasaalisissa että koko kehoon kohdistuvissa altistuksissa, ja se on kirjattava kerran tunnissa kunkin altistuksen aikana, mikäli mahdollista. Suhteellisen kosteuden tulisi olla välillä 30–70 prosenttia, mutta tämä ei ole välttämättä mahdollista (esimerkiksi testattaessa vesipohjaisia seoksia) tai mitattavissa, koska testikemikaali häiritsee testimenetelmää.

Testikemikaali: nimellispitoisuus

23. Aina kun mahdollista, altistuskammion nimellispitoisuus on laskettava ja kirjattava. Nimellispitoisuus on tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammiojärjestelmän läpi virtaavan ilman kokonaistilavuudella. Nimellispitoisuudella ei luonnehdita eläinten altistumista, vaan nimellispitoisuuden ja varsinaisen pitoisuuden vertailusta saadaan tietoa testijärjestelmän generointitehokkuudesta, ja sitä voidaan siis käyttää generointiongelmien havaitsemiseen.

Testikemikaali: todellinen pitoisuus

24. Todellinen pitoisuus on testikemikaalin pitoisuus eläinten hengitysilmassa inhalaatiokammiossa. Todelliset pitoisuudet saadaan tietyillä menetelmillä (esimerkiksi suoralla näytteenotolla, adsorptiivisilla tai kemiallisesti reaktiivisilla menetelmillä ja tulosten analyyttisella luonnehtimisella) tai muilla menetelmillä, kuten suodatukseen perustuvalla gravimetrisella analyysilla. Gravimetrisen analyysin käyttö on hyväksyttävää vain yksikomponenttisten jauhemaisten aerosolien tai heikosti haihtuvista nesteistä koostuvien aerosolien yhteydessä, ja sitä on tuettava asianmukaisella esitutkimuksella, jossa käsitellään testikemikaalia koskevia luonnehdintoja. Monikomponenttisten jauhemaisten aerosolien pitoisuus voidaan myös määrittää gravimetrisen analyysin avulla. Siihen tarvitaan kuitenkin analyysitietoja, jotka osoittavat, että ilmassa leijuvan materiaalin koostumus on sama kuin lähtömateriaalin. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, testikemikaali voi olla tarpeen analysoida uudelleen (mieluiten ilmassa leijuvassa muodossaan) säännöllisin väliajoin tutkimuksen aikana. Sellaisten aerosolisoituvien aineiden osalta, jotka voivat höyrystyä tai sublimoitua, on osoitettava, että valitulla menetelmällä kerättiin kaikki faasit.

25. Jos mahdollista, koko tutkimuksen keston ajan on käytettävä yhdestä erästä peräisin olevaa testikemikaalia, ja testinäyte on säilytettävä sen puhtauden, homogeenisuuden ja stabiiliuden säilyttävissä olosuhteissa. Ennen tutkimuksen aloittamista testikemikaalista on laadittava luonnehdinta, johon on sisällyttävä sen puhtaus ja – mikäli teknisesti mahdollista – identiteetti sekä tunnistettujen kontaminanttien ja epäpuhtauksien määrät. Tämä voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavien tietojen avulla: retentioaika ja piikin suhteellinen pinta-ala sekä molekyylipaino, joka on saatu massaspektroskopialla tai kaasukromatografia-analyyseista, tai muut estimaatit. Vaikka testinäytteen identiteetti ei kuulu testauslaboratorion vastuulle, sen voi olla järkevää vahvistaa rahoittajan laatima luonnehdinta ainakin joiltain osin (esimerkiksi väri, fysikaalinen olomuoto jne.).

▼M4

26. Altistusilmakehä on pidettävä mahdollisimman muuttumattomana. Altistusolosuhteiden stabiiliuden osoittamiseen voidaan käyttää reaaliaikaista seurantalaitetta, kuten aerosolifotometria aerosoleille tai hiilivetyanalysaattoria höyryille. Kammion todellinen pitoisuus on mitattava vähintään kolme kertaa jokaisena altistuspäivänä ja jokaiselta altistustasolta. Jos se ei ole mahdollista pienen ilmavirtauksen tai pienten pitoisuuksien vuoksi, yksi näyte altistuskertaa kohti hyväksytään. Tällöin tämä näyte on mielellään kerättävä koko altistuskerran ajalta. Yksittäiset kammion pitoisuusnäytteet eivät saa poiketa keskimääräisestä pitoisuudesta enempää kuin enintään ± 10 prosenttia kaasujen ja höyryjen osalta tai enintään ± 20 prosenttia nestemäisten tai kiinteiden aerosolien osalta. Kammion tasapainotukseen kulunut aika (t_{95}) on laskettava ja kirjattava. Altistuksen kesto käsittää ajan, jolloin testikemikaali muodostetaan. Tässä otetaan huomioon hajoamiseen ja kammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95}). Ohjeita t_{95}-ajan arvioimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

27. Hyvin monimutkaisten, kaasuista/höyryistä koostuvien seosten ja aerosolien (esimerkiksi polttokammiot ja tietyn tarkoituksen mukaisten lopputuotteiden/-laitteiden perusteella kehitetyt testikemikaalit) osalta kukin faasi voi käyttäytyä inhalaatiokammiossa eri tavoin. Sen vuoksi jokaisesta faasista (kaasu/höyry ja aerosoli) on valittava vähintään yksi indikaattoriaine (analyytti), yleensä seoksen pääasiallinen vaikuttava aine. Kun testikemikaali on seos, on ilmoitettava koko seoksen analyyttinen pitoisuus, ei siis pelkästään vaikuttavan aineen tai indikaattoriaineen (analyytin) pitoisuutta. Lisätietoja todellisista pitoisuuksista on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Testikemikaali: hiukkaskokojakauma

28. Aerosolien hiukkaskokojakauma on määritettävä vähintään kerran viikossa jokaisesta pitoisuudesta käyttämällä kaskadierotinta tai jotain vaihtoehtoista laitetta, kuten aerodynaamista hiukkaskokoluokittelijaa. Jos kaskadierottimella tai muulla laitteella saatujen tulosten välinen vastaavuus voidaan osoittaa, vaihtoehtoista laitetta voidaan käyttää koko tutkimuksen ajan.

29. Ensisijaisen laitteen rinnalla on käytettävä toissijaista laitetta, esimerkiksi gravimetrista suodatinta tai törmäytintä/kuplituslaitetta ensisijaisen laitteen keräystehon vahvistamiseksi. Hiukkaskoon analyysista saadun massapitoisuuden on sijoituttava kohtuullisessa määrin suodatusanalyysilla saadun massapitoisuuden rajoihin [katso GD 39 (2)]. Jos vastaavuus voidaan osoittaa kaikkien pitoisuuksien osalta tutkimuksen varhaisessa vaiheessa, myöhemmät vahvistavat mittaukset voidaan jättää tekemättä. Eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi on pyrittävä minimoimaan epävarmat tiedot, jotta altistusta ei tarvitse toistaa.

30. Höyryjen osalta hiukkaskoko on määritettävä, jos on mahdollista, että höyryn tiivistyessä muodostuu aerosolia, tai jos höyryatmosfäärissä, jossa faasien sekoittuminen on mahdollista, havaitaan hiukkasia.

HAVAINNOT

31. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti ja säännöllisesti ennen altistusjaksoa, sen aikana ja sen jälkeen. Tiiviimpi tarkkailu voi olla aiheenmukaista sen perusteella, millainen vaste eläimille muodostuu altistuksen aikana. Kun eläinten tarkkailu ei ole mahdollista immobilisointiputkien, huonosti valaistujen koko kehon altistuskammioiden tai läpinäkymättömien ilmakehien vuoksi, eläimiä on tarkkailtava huolellisesti altistuksen jälkeen. Myrkyllisten vaikutusten korjaantuvuutta tai pahenemista voidaan arvioida ennen seuraavan päivän altistusta tehtävillä havainnoilla.

▼M4

32. Kaikki havainnot kirjataan jokaisesta eläimestä erikseen. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

33. Häkin vieressä tehtyihin havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, hermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljenerityksen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Lämmön mittaaminen peräsuolesta voi antaa tukevaa näyttöä refleksinomaisesta bradypneasta tai käsittelyyn tai ahtaaseen tilaan liittyvästä tai hypo-/hypertermiasta. Tutkimussuunnitelmaan voidaan sisällyttää muita arviointeja, kuten kinetiikka, biomonitorointi, keuhkojen toiminta, huonosti liukenevien, keuhkokudokseen kertyvien materiaalien retentio sekä käyttäytymisen muutokset.

RUUMIINPAINOT

34. Eläinyksilöiden painot on kirjattava vähän ennen ensimmäistä altistusta (päivä 0) ja sen jälkeen kahdesti viikossa (esimerkiksi perjantaisin ja maanantaisin, jotta voidaan osoittaa toipuminen altistuksettoman viikonlopun tai tietyn ajan jälkeen systeemisen toksisuuden arvioimiseksi) sekä kuolinhetkellä tai lopettamisen yhteydessä. Jos eläimessä ei ilmene vaikutuksia kahden ensimmäisen viikon aikana, ruumiinpainot voidaan punnita kerran viikossa tutkimuksen loppuun saakka. Satelliittiryhmän (korjaantuvuusryhmän) eläinten (jos käytössä) punnitsemista viikoittain on jatkettava koko toipumisjakson ajan. Tutkimuksen päättyessä kaikki eläimet on punnittava vähän ennen niiden lopettamista, jotta elinten ja ruumiinpainon väliset suhteet voidaan laskea ilman vääristymiä.

RAVINNON JA VEDEN KULUTUS

35. Ravinnon kulutus on mitattava viikoittain. Myös veden kulutus voidaan mitata.

KLIININEN KEMIA

36. Kaikista eläimistä, myös verrokki- ja satelliittiryhmän (korjaantuvuusryhmän) eläimistä, on tehtävä kliinis-kemialliset arvioinnit, kun ne lopetetaan. Altistuksen päättymisen ja verinäytteen ottamisen välinen aika on merkittävä muistiin varsinkin, jos kyseinen tutkittava ominaisuus rekonstituoituu nopeasti. Niistä parametreista, joiden puoliintumisaika plasmassa on lyhyt (esimerkiksi COHb, CHE ja MetHb), on syytä ottaa näyte heti altistuksen päätyttyä.

37. Taulukossa 1 luetellaan ne kliinis-kemialliset parametrit, jotka yleensä vaaditaan kaikissa toksikologisissa tutkimuksissa. Virtsa-analyysia ei yleensä tarvita. Se tehdään silloin, kun oletettu tai todettu myrkyllisyys antaa siihen aihetta. Jotta testikemikaalin myrkyllisyyttä voitaisiin luonnehtia tarkemmin, tutkimuksen johtaja voi päättää arvioida myös muita parametreja (esimerkiksi koliiniesteraasi, lipidit, hormonit, happo-emästasapaino, methemoglobiini tai Heinzin kappaleet, kreatiinikinaasi, myelosyyttien ja punasolujen suhde, troponiinit, valtimoverikaasut, laktaattidehydrogenaasi, sorbitolidehydrogenaasi, glumaattidehydrogenaasi ja gammaglutamyylitranspeptidaasi).

▼M4

Taulukko 1

Kliinis-kemialliset vakioparametrit

Hematologia	
Punasolujen määrä	Valkosolujen kokonaismäärä
Hematokriitti	Valkosolujen erittely
Hemoglobiinipitoisuus	Verihiutaleiden määrä
Keskihemoglobiini (MCH)	Hyytymisominaisuudet (valittava yksi):
Punasolujen keskimääräinen tilavuus (MCV)	— Protrombiiniaika
Keskihemoglobiinikonsentraatio (MCHC)	— Hyytymisaika
Retikulosyytit	— Partiaalinen tromboplastiiniaika
Kliininen kemia	
Glukoosi (*)	Alaniiniaminotransferaasi
Kokonaiskolesteroli	Aspartaattiaminotransferaasi
Triglyseridit	Alkaalifosfataasi
Veren ureatyppi	Kalium
Kokonaisbilirubiini	Natrium
Kreatiniini	Kalsium
Kokonaisproteiini	Fosfori
Albumiini	Kloridi
Globuliini	
Virtsa-analyysi (valinnainen)	
Ulkonäkö (väri ja sameus)	Kokonaisproteiini
Määrä	Glukoosi
Ominaistiheys tai osmolaliteetti	Veri/verisolut
pH	

(*) Koska pitkähkö paastojakso voi vääristää glukoosinmittauksen tuloksia (käsitellyt eläimet vs. verrokkieläimet), tutkimuksen johtajan on päätettävä, onko eläinten pitäminen ravinnotta tarpeen. Jos paastojaksoa käytetään, sen on oltava käytetyille lajeille sopiva, esimerkiksi rotalle paastoajan pituus voi olla 16 h (ravinnotta yli yön). Paastoverensokeri voidaan määrittää yli yön toteutetun paaston jälkeen viimeisellä altistusviikolla tai yli yön paastoamisen jälkeen ennen ruumiinavausta (jälkimmäisessä tapauksessa on määritettävä myös kaikki muut kliinis-kemialliset parametrit).

38. Jos on todisteita siitä, että alemmat hengitystiet (esimerkiksi keuhkorakkulat) ovat ensisijainen kertymä- ja retentiopaikka, bronkoalveolaarinen huuhtelu voi olla sopiva tekniikka analysoida määrällisesti hypoteesiperusteiset annos-vaikutus-parametrit, jotka kohdistuvat keuhkorakkulatulehdukseen, keuhkotulehdukseen ja fosfolipidoosiin. Tämän avulla voidaan testata annosvaste ja keuhkorakkuloiden vaurioiden ajalliset muutokset. Huuhtelunesteestä voidaan analysoida valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erottelu, kokonaisproteiini ja laktaattidehydrogenaasi. Lisäksi voidaan analysoida parametreja, jotka viittaavat lysosomien vaurioihin, fosfolipidoosiin, fibroosiin sekä ärsytyksen aiheuttamaan tai allergiseen tulehdukseen, johon voi sisältyä esitulehduksellisten sytokiinien/kemokiinien määritys. Bronkoalveolaariseen huuhteluun perustuvat mittaukset yleensä täydentävät histopatologisten tutkimusten tuloksia mutta eivät korvaa niitä. Ohjeita keuhkohuuhtelun tekemisestä on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

▼M4

MAKROSKOOPPISET MUUTOKSET JA ELINTEN PAINOT

39. Kaikille koe-eläimille, myös kokeen aikana kuolleille tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi lopetetuille ja tutkimuksesta poistetuille, on tehtävä täydellinen verenlasku ja ruumiinavaus. Jokaisen eläimen viimeisen altistuksen ja lopetuksen välinen aika on merkittävä muistiin. Jos ruumiinavausta ei voida tehdä heti kun eläimen on havaittu kuolleen, eläintä on säilytettävä riittävän kylmässä lämpötilassa (ei pakastimessa) autolyysin minimoimiseksi. Ruumiinavaukset on tehtävä mahdollisimman pian, yleensä yhden tai kahden päivän kuluessa. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata, ja erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteissä oleviin muutoksiin.

40. Taulukossa 2 on lueteltu kaikki elimet ja kudokset, jotka on säilytettävä sopivassa aineessa histopatologista tutkimusta varten. [Hakasulkeisiin] merkittyjen elinten ja kudosten säilyttämisestä päättää tutkimuksen johtaja. **Lihavoidut** elimet ja kudokset on puhdistettava ja punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen välttämiseksi. Kilpirauhanen ja lisäkivekset on punnittava vain tarvittaessa, koska puhdistuksen aiheuttamat vahingot voivat estää histopatologisen arvioinnin. Kudokset ja elimet on kiinnitettävä 10-prosenttisella puskuroidulla formaliinilla tai muulla sopivalla kiinnitysaineella heti ruumiinavauksen jälkeen, vähintään 24–48 tuntia ennen puhdistusta sen mukaan, mitä kiinnitysainetta käytetään.

Taulukko 2

Ruumiinavauksen aikana säilöttävät elimet ja kudokset

Lisämunuaiset	Rakkularauhaset
Luuydin (ja/tai tuore aspiraatti)	Selkäydin (kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	**Perna**
[Silmät (verkkokalvo, silmähermo) ja silmäluomet]	Maha
Sydän	**Kivekset**
Munuaiset	**Kateenkorva**
Kurkunpää (kolmesta kohdasta, joista yhden on oltava kurkunkansi)	Kilpirauhanen
Maksa	Henkitorvi (vähintään kahdesta kohdasta siten, että mukana on yksi pitkittäinen leikkaus harjun läpi ja yksi poikittainen leikkaus)
Keuhkot (kaikki lohkot yhdestä kohdasta, mukaan luettuina pääkeuhkoputket)	[Virtsarakko]
Imusolmukkeet keuhkoportin alueelta etenkin huonosti liukenevien hiukkasmaisten testikemikaalien yhteydessä. Tarkempia kokeita ja/tai tutkimuksia, joissa keskitytään immunologiaan, voidaan käyttää myös muita imusolmukkeita esimerkiksi välikarsinan, servikaaliselta/submandibulaariselta ja/tai aurikulaariselta alueelta.	Kohtu
	Kaikki suuret leesiot
Nenänielun kudokset (vähintään neljästä kohdasta, yhden kohdan on oltava nenänielukanava ja NALT-imukudos (Nasal Associated Lymphoid Tissue)	
Ruokatorvi	
[Hajurauhanen]	
Munasarjat	

▼M4

41. Keuhkot on poistettava kokonaisina, punnittava ja täytettävä sopivalla kiinnitysaineella 20–30 cm:n syvyisen veden paineessa, jotta niiden rakenne säilyy (5). Leikkeet on kerättävä kaikista lohkoista yhdestä kohdasta pääkeuhkoputket mukaan luettuina, mutta jos tehdään keuhkohuuhtelu, huuhtelemattomasta lohkosta on otettava leikkeet kolmesta kohdasta (ei sarjaleikkeitä).

42. Nenänielun kudoksista on tutkittava vähintään neljästä kohdasta otetut näytteet, joista yhden on oltava nenänielukanava (5, 6, 7, 8, 9), jotta levyepiteeli, välimuotoinen epiteeli (värekarvaton hengitysepiteeli), hengitysepiteeli (värekarvallinen), hajuepiteeli sekä imukudos (NALT; 10, 11) voidaan tutkia. Kurkunpäästä on tutkittava kolmesta kohdasta otetut leikkeet, ja yhden niistä on oltava kurkunpään kansi (12). Henkitorvesta on tutkittava vähintään kahdesta kohdasta otetut leikkeet, joista toisen on oltava pitkittäinen leike ekstrapulmonaalisten keuhkoputkien ja henkitorven harjun haarautuman läpi ja toisen poikittaisleike.

HISTOPATOLOGIA

43. Histopatologinen arviointi on tehtävä kaikkien taulukossa 2 lueteltujen elinten ja kudosten osalta niin verrokkiryhmästä kuin suuren pitoisuuden ryhmästä sekä kaikista eläimistä, jotka kuolevat tai jotka lopetetaan tutkimuksen aikana. Erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteihin, kohde-elimiin ja näkyviin vammoihin. Ne elimet ja kudokset, joissa suuren pitoisuuden ryhmän eläimillä on leesioita, on tutkittava kaikista ryhmistä. Tutkimuksen johtaja voi päättää toteuttaa histopatologiset arvioinnit myös muista ryhmistä selvän pitoisuus-vasteen osoittamiseksi. Kun tutkimukseen sisältyy satelliittiryhmä (korjaantuvuus), sellaiset kudokset ja elimet, joissa ilmenee samoja vaikutuksia kuin käsitellyillä ryhmillä, on tutkittava histopatologisesti. Jos suuren pitoisuuden ryhmässä on hyvin paljon varhaisia kuolemantapauksia tai muita ongelmia, jotka vaarantavat tietojen merkityksellisyyden, seuraava pienemmän pitoisuuden ryhmä on tutkittava histopatologisesti. Silmämääräisten havaintojen ja mikroskooppisten löydösten välille on pyrittävä löytämään korrelaatio.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

44. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava seuraavat tiedot: ruumiinpaino, ravinnonkulutus, kliinis-kemialliset tiedot, makroskooppiset muutokset sekä histopatologiset löydökset. Kliiniset havaintotiedot tulee esittää yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin koeryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, toksisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset. Kaikki tulokset, niin määrälliset kuin satunnaiset, on arvioitava sopivalla tilastomenetelmällä. Kaikkia yleisesti hyväksyttyjä tilastomenetelmiä voi käyttää, ja ne on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

Testiraportti

45. Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet ja niiden hoito

— kuvaus häkkiolosuhteista, mukaan luettuina seuraavat tiedot: yhdessä häkissä olevien eläinten lukumäärä (tai lukumäärän muutos), alustamateriaali, lämpötila ja suhteellinen kosteus, valoisa aika ja tiedot ravinnosta

▼M4

— käytetyt lajit/kanta ja perustelu muun lajin kuin rotan käyttämiselle tietoja lähteestä ja aiemmin saatuja tietoja voi ilmoittaa, jos ne koskevat eläimiä, jotka on altistettu samankaltaisessa altistuksessa ja joiden asumis- ja paasto-olosuhteet ovat olleet samat

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— satunnaistamismenetelmä

— kuvaus testiä edeltäneestä tilanteesta ja tiedot ravinnosta, karanteenista ja sairauden hoidosta.

Testikemikaali

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (mukaan luettuna isomeria)

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään.

Kantaja-aine

— perustelut kantaja-aineen käyttämiselle ja sen valinnalle (jos se on muu kuin vesi)

— aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saadut tiedot, jotka osoittavat, ettei kantaja-aine vaikuta tutkimuksen tulokseen.

Inhalaatiokammio

— yksityiskohtainen kuvaus inhalaatiokammiosta, mukaan luettuina tilavuus ja kaavakuva

— kuvaus eläinten altistukseen ja ilmakehän tuottamiseen käytetystä laitteistosta ja sen alkuperä

— lämmön, kosteuden, hiukkaskoon ja todellisen pitoisuuden mittauslaitteet

— ilman lähde ja ilmanvaihtojärjestelmä

— menetelmät, joilla laitteisto on kalibroitu yhtenäisen testi-ilmakehän varmistamiseksi

— paine-ero (yli- vai alipaine)

— kunkin kammion altistusportit (vain nasaalinen altistus); eläinten sijainti kammiossa (koko kehoon kohdistuva altistus)

— testi-ilmakehän stabiilius

— lämpötila- ja kosteusantureiden sekä testi-ilmakehän näytteenottopaikan sijainti kammiossa

— tulo- ja poistoilman käsittely

— ilman virtausnopeudet, ilman virtausnopeus kussakin altistusportissa (vain nasaalinen altistus) tai eläinkuorma/kammio (koko kehoon kohdistuva altistus)

— inhalaatiokammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95})

— tilavuusmuutosten määrä tunneittain

— annostelulaitteet (tarvittaessa).

Altistustiedot

— päätutkimuksen tavoitepitoisuuden valinnan peruste

▼**M4**

— nimellispitoisuudet (altistuskammioon tuotetun testikemikaalin kokonaismassa jaettuna kammion läpi virtaavan ilman tilavuudella)

— eläinten hengitysilmasta kerätyt testikemikaalin todelliset pitoisuudet; epäyhtenäisiä fyysisiä muotoja (kaasuja, höyryjä, aerosoleja) tuottavien seosten osalta jokainen voidaan analysoida erikseen

— kaikki ilmapitoisuudet on ilmoitettava mieluummin massayksikköinä (esimerkiksi mg/l, mg/m^3, jne.) kuin tilavuusyksikköinä (ppm, ppb jne.)

— hiukkaskokojakauma, massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (σg) sekä niiden laskentamenetelmät yksittäiset hiukkaskokoanalyysit on myös esitettävä.

Testiolosuhteet

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin valmistelusta, mukaan luettuina tiedot kiinteiden materiaalien hiukkaskoon pienentämisessä tai testikemikaaliliuosten valmistamisessa käytetyistä menetelmistä

— (mieluiten kaavion sisältävä) kuvaus testi-ilmakehän tuottamiseen ja eläinten altistamiseen testi-ilmakehälle käytetystä laitteistosta

— yksityiskohdat kammion lämpötilan, kosteuden ja ilmanvirtauksen seuraamiseen käytetystä laitteistosta (esimerkiksi kalibrointikäyrän laatiminen)

— yksityiskohdat kammion pitoisuuden ja hiukkaskokojakauman määrittämisessä tarvittavien näytteiden keräämiseen tarkoitetusta laitteistosta

— tiedot käytetystä kemiallisesta analyysimenetelmästä ja sen validointimenetelmästä (myös tiedot siitä, miten tehokasta testikemikaalin saanto oli näytteenottokohdasta)

— satunnaistamismenetelmä, jolla eläimet jaettiin testi- ja verrokkiryhmiin

— tiedot ravinnon ja veden laadusta (sekä ravinnon tyyppi/lähde, veden lähde)

— testipitoisuuksien valintaperuste.

Tulokset

— kammion lämpötila, kosteus ja ilmanvirtaus (taulukkomuodossa)

— tiedot nimellisistä ja todellisista pitoisuuksista kammiossa (taulukkomuodossa)

— hiukkaskokotiedot sekä analyyttiset tiedot näytteen keräämisestä, hiukkaskokojakaumasta ja MMAD-arvon ja σ_g-arvon laskelmat (taulukkomuodossa)

— kunkin eläimen vastetulosten ja pitoisuustason taulukot (ts. eläimet, joilla ilmeni toksisuusoireita, mukaan lukien kuolleisuus, vaikutusten luonne, vaikeusaste, alkamisajankohta ja kesto)

▼M4

— taulukko kunkin eläimen painoista

— taulukko ravinnonkulutuksesta

— taulukko kliinis-kemiallisista tiedoista

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla

— taulukko muista mitatuista parametreista.

Tulosten pohdinta ja tulkinta

— On kiinnitettävä erityistä huomiota niiden menetelmien kuvaukseen, joita tämän testimenetelmän vaatimusten (rajapitoisuus tai hiukkaskoko) täyttämisessä käytettiin.

— Hiukkasten hengitettävyyttä on käsiteltävä kaikkien löydösten kannalta etenkin, jos hiukkaskokoon liittyvää kriteeriä ei voitu täyttää.

— Tutkimuksen kokonaisarviointiin on sisällytettävä tiedot nimellisten ja todellisten pitoisuuksien määrittämiseen käytettyjen menetelmien yhtenäisyydestä sekä todellisen ja nimellisen pitoisuuden suhde.

— Raportissa on käsiteltävä myös todennäköistä kuolinsyytä ja pääasiallista vaikutustapaa (systeeminen vs. paikallinen).

— Jos kärsiviä tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavia eläimiä oli lopetettava humaanisti eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (3) olevien perustelujen mukaisesti, siitä on esitettävä selvitys.

— Kohde-elin (-elimet) on määritettävä.

— NOAEL- ja LOAEL-arvot on määritettävä.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229–258.

6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼**M4**

8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

13) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼B

B.9. **TOISTETUN ANNOKSEN (28 PÄIVÄÄ) MYRKYLLISYYS (IHON KAUTTA NAUTITTAVAT AINEET)**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testattavaa ainetta levitetään useisiin ryhmiin jaettujen eläinten iholle porrastettuina annoksina (yksi annos ryhmää kohti) säännöllisesti 28 päivän koejakson aikana. Jakson aikana eläimiä tarkkaillaan myrkytysoireiden suhteen. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Ennen testiä eläinten elinolosuhteet pidetään tietyntyyppisinä vähintään viiden päivän ajan testin suorittamista silmälläpitäen. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan käsittely- ja vertailuyryhmiin. Noin 24 tuntia ennen testiä turkki leikataan tai ajetaan eläinten selkäalueelta varoen naarmuttamasta ihoa, koska naarmut saattavat muuttaa ihon läpäisevyyttä. Turkinpoisto on yleensä uusittava noin viikon välein. Vähintään 10 % kehon pinta-alaa peittävästä karvasta on ajeltava tai leikattava. Koe-eläimen paino on otettava huomioon suunniteltaessa paljastettavan alueen ja siteen suuruutta. Kiinteät aineet voidaan tarvittaessa jauhaa, ja ne on kosteutettava riittävällä vesimäärällä tai tarvittaessa muulla liuottimella hyvän ihokontaktin varmistamiseksi. Nestemäisiä aineita käytetään yleensä laimentamattomina. Käsittely toistetaan päivittäin 5–7 päivänä viikossa.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Koe-eläiminä voidaan käyttää aikuisia rottia, kaneja tai marsuja. Muiden lajien käyttö on perusteltava.

▼B

Testin alussa kumpaakaan sukupuolta edustavien eläinten painonvaihtelut eivät saa olla enempää kuin ± 20 % sukupuolen keskiarvosta.

1.6.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Jokaista annostasoa kohti tarvitaan vähintään kymmenen eläintä (viisi naarasta ja viisi urosta). Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä. Jos suunnitellaan testin kuluessa tapahtuvia lopettamisia, eläinten määrää on lisättävä vastaavasti. Tarvittaessa testiin voidaan ottaa kymmenen eläimen apuryhmä (viisi naarasta ja viisi urosta), jota altistetaan suurille annoksille 28 päivän ajan tarkkaillen myrkytysoireiden palautumista ja pysyvyyttä sekä sitä, esiintyykö käsittelyä seuraavan 14 päivän jakson aikana viivästyneitä myrkytysoireita. Tarvitaan myös kymmenen vertailueläimen (viiden naaran ja viiden uroksen) apuryhmä.

1.6.2.3 *Altistuspitoisuudet*

Tarvitaan vähintään kolme pitoisuustasoa ja yksi kontrolliryhmä. Jos testattava aine liuotetaan apuaineeseen, tätä varten tarvitaan erillinen kontrolliryhmä. Päivittäisen altistuksen on kestettävä vähintään kuusi tuntia. Ainetta levitetään samaan aikaan joka päivä, ja annosta säädetään 1-2 viikon välein siten, että pitoisuustasot pysyvät vakiona eläimen painoon nähden. Aineella käsittelyä lukuun ottamatta kontrolliryhmän ja käsittelyryhmien eläimiä on käsiteltävä samalla tavalla. Jos annostelun yhteydessä käytetään liuotinta apuaineena, liuotinta annostellaan kontrolliryhmän eläimille samalla menetelmällä kuin käsittelyryhmän eläimille määränä, joka vastaa suurinta käsittelyannosta. Suurimman annostason on aiheutettava myrkytysoireita, mutta vain vähän tai ei lainkaan kuolleisuutta. Pienimmän annostason ei pidä aiheuttaa lainkaan myrkytysoireita. Jos käytettävissä on soveltuva arvio ihmisaltistumisesta, pienimmän annostason on ylitettävä tämä taso. Keskimmäisen annostason tulee aiheuttaa mahdollisimman vähän myrkytysoireita. Jos käytetään useita välitasoja, ne on valittava siten, että myrkytysoireet porrastuvat. Alimman annostason ja välitason ryhmissä sekä kontrolliryhmissä kuolleisuuden on oltava pieni, jotta tuloksia voidaan arvioida merkityksellisellä tavalla.

Jos aine aiheuttaa vakavaa ihoärsytystä iholle levitettynä, pitoisuuksia on pienennettävä, mikä voi aiheuttaa suurannosryhmän eläimille muiden myrkytysoireiden vähenemistä tai oireiden häviämisen. Jos eläimen iho on pahoin vaurioitunut, voi olla tarpeen keskeyttää koe ja uusia se pienempiä pitoisuuksia käyttäen.

1.6.2.4 *Rajatesti*

Jos suoritetaan alustava koe käyttäen annostasoa 1 000 mg/kg tai tätä korkeampaa tasoa, joka perustuu tunnettuun ihmisaltistukseen, eikä tällainen testi aiheuta myrkytysoireita, lisätestit voidaan katsoa tarpeettomiksi.

1.6.2.5 *Tarkkailujakso*

Kaikkia eläimiä on tarkkailtava päivittäin myrkytysoireiden suhteen. Kuolinajankohta ja myrkytysoireiden llmestymis- sekä häviämisajankohta kirjataan.

▼B

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Eläimiä pidetään yksin häkeissä. Eläimiä käsitellään testattavalla aineella mieluiten seitsemänä päivänä viikossa 28 päivän ajan. Seurantaa varten koottuja apuryhmiä tarkkaillaan altistusjakson jälkeen vielä 14 päivän ajan ilman käsittelyä, jotta voidaan todeta, ovatko myrkytysoireet häviäviä vai pysyviä. Päivittäisen altistuksen on kestettävä vähintään kuusi tuntia.

Testattavaa ainetta levitetään tasaisesti alueelle, joka vastaa noin 10 %:a kehon kokonaispinta-alasta. Erittäin myrkyllisten aineiden kohdalla voidaan käyttää pienempää pinta-alaa, mutta ainetta on levitettävä mahdollisimman ohuelti ja tasaisesti niin suurelle alueelle kuin mahdollista.

Altistuksen aikana ihoalue peitetään harsositeellä ja ärsyttämättömällä laastarilla. Tämän lisäksi alue on peitettävä, niin että harsoside ja aine pysyvät paikallaan eikä eläin pääse syömään ainetta. Eläin voidaan sitoa osittain siten, ettei se pysty syömään ainetta. Täydellistä liikkumattomuutta ei kuitenkaan suositella. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää suojakaulusta.

Altistusjakson jälkeen aineen jäännökset poistetaan vedellä tai muulla sopivalla ihonpuhdistusmenetelmällä.

Eläimiä on tarkkailtava säännöllisesti, jotta voidaan varmistaa, että mahdollisimman vähän eläimiä menetetään kannibalismin, kudosten autolyysin tai sijoitusvirheiden takia. Testijakson jälkeen kaikki aineelle altistuneet eläimet lopetetaan. Kuolemaisillaan olevat eläimet tai eläimet, joilla on vakavia ahdistuneisuuden tai kivun oireita, on poistettava ryhmästä ja lopetettava, minkä jälkeen niille tehdään ruumiinavaus.

Testijakson päätyttyä kaikki eläimet, kontrolliryhmien eläimet mukaan lukien, tutkitaan seuraavilta osin:

1) hematologia — vähintään hematokriitti, hemoglobiinipitoisuus, punasolujen lukumäärä, valkosolujen kokonaismäärä ja erittelylaskenta sekä hyytymistekijät;

2) kliininen veribiokemia — vähintään yksi parametri seuraavista maksan ja munuaisten toimintakokeista, alaniiniaminotransferaasi (ALAT), seeruminaspartaattiaminotransferaasi (ASAT), virtsa-aineen typpi, albumiini, veren kreatiniini, kokonaisbilirubiini ja seerumin kokonaisproteiini.

Muita, riittävän toksikologisen arvion kannalta tärkeitä määrityksiä ovat kalsium, fosfori, kloridi, natrium, kalium, paastoverensokeri, lipidit, hormonit, happo-emästasapaino, methemoglobiini ja kolinesteraasiaktiivisuus.

▼B

Havaittujen oireiden tutkimista voidaan tarvittaessa laajentaa muita kliinisiä biokemianmäärityksiä käyttämällä.

1.6.4 **Kattava ruumiinavaus**

Kaikille kokeeseen osallistuneille eläimille on tehtävä kattava ruumiinavaus. Vähintään maksa, munuaiset, lisämunuaiset ja kivekset on punnittava märkinä mahdollisimman pian dissektion jälkeen. Elimet ja kudokset (maksa, munuaiset, perna, kivekset, lisämunuaiset, sydän ja muut elimet, joissa on oleellisia vaurioita tai kokomuutoksia) on säilytettävä sopivassa aineessa mahdollisia myöhemmin tehtäviä histopatologisia tutkimuksia varten.

1.6.5 **Histopatologinen tutkimus**

Suurannosryhmän ja kontrolliryhmän eläinten säilötyille elimille ja kudoksille on tehtävä histologinen tutkimus. Jos suurimman annoksen saaneen ryhmän eläinten elimissä ja kudoksissa on testattavasta aineesta johtuvia vaurioita, myös pienempien annoskokojen ryhmien eläinten vastaavat elimet on tutkittava. Kaikkien apuryhmien eläimet on tutkittava histologisesti kiinnittäen erityistä huomiota niihin elimiin ja kudoksiin, joissa on havaittu muutoksia käsiteltyjen ryhmien kohdalla.

2. **TIEDOT**

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, jossa esitetään eläinten määrä kokeen alussa ja eläinten määrä kutakin vauriota kohti ryhmittäin.

Kaikki havaintotulokset on arvioitava soveltuvan tilastollisen menetelmän avulla. Tarkoitukseen voidaan käyttää kaikkia yleisiä menetelmiä.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio jne.,

— testiolosuhteet (mukaan lukien siteen tyyppi, okklusiivinen tai ei-okklusiivinen),

— annostasot (annoksen suuruus apuaine mukaan lukien ja mahdollinen testattavan aineen pitoisuus),

— oireita tuottamaton annostaso, mikäli mahdollista,

— vastetietojen luokittelu sukupuolen ja annostason mukaan,

— kuolinajankohdat kokeen aikana tai eläinten hengissäpysyminen kokeen loppuun,

— myrkytysoireet ja muut vaikutukset,

— ajankohdat, jolloin on havaittu poikkeavuuksia, ja poikkeavuuksien kehittyminen jatkossa,

— tiedot ruoasta ja kehonpainosta,

— käytetyt hematologiset testit tuloksineen,

▼B

— käytetyt kliinis-biokemialliset testit tuloksineen,

— ruumiinavauslöydökset,

— histopatologisten löydösten yksityiskohtaiset kuvaukset,

— tulosten tilastollinen käsittely soveltuvin osin,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4. **VIITTEET**

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

▼B

B.10. **MUTAGEENISUUS — KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI NISÄKÄSSOLUILLA *IN VITRO***

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 JOHDANTO

In vitro -kromosomipoikkeavuustestin tarkoituksena on tunnistaa aineet, jotka aiheuttavat rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia viljellyissä nisäkässoluissa (1) (2) (3). Rakenteelliset poikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Kemiallisten mutageenien aiheuttamat poikkeavuudet ovat useimmiten kromatidityyppisiä, mutta myös kromosomityyppisiä poikkeavuuksia esiintyy. Polyploidian lisääntyminen saattaa osoittaa, että kemiallinen aine voi aiheuttaa numeerisia poikkeavuuksia. Tätä menetelmää ei ole kuitenkaan suunniteltu numeeristen poikkeavuuksien mittaamiseen, eikä sitä käytetä rutiininomaisesti tähän tarkoitukseen. Kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat ovat syynä moniin ihmisen geneettisiin sairauksiin, ja on saatu vakuuttavia todisteita siitä, että kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat, jotka aiheuttavat muutoksia somaattisten solujen onkogeeneissä ja kasvunrajoitegeeneissä, ovat osallisina syövän synnyssä ihmisillä ja koe-eläimillä.

In vitro -kromosomipoikkeavuustestissä voidaan käyttää pysyvien solulinjojen viljelmiä, solukantoja tai primaarisia soluviljelmiä. Käytettävien solujen valintakriteerejä ovat solujen kasvukyky viljelmässä, karyotyypin pysyvyys, kromosomiluku, kromosomien diversiteetti ja kromosomipoikkeavuuksien spontaanifrekvenssi.

In vitro -testit vaativat yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiota. Tällainen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei pysty täysin jäljittelemään in vivo -olosuhteita nisäkkäissä. On pyrittävä välttämään erityisesti sellaisia olosuhteita, joissa saatavat positiiviset tulokset eivät heijasta aineen luontaista mutageenisuutta ja saattavat johtua pH:n muutoksista, osmolaliteetista tai voimakkaasta sytotoksisuudesta (4) (5).

Tätä testiä käytetään nisäkkäiden mahdollisten mutageenien ja karsinogeenien seulontaan. Monet yhdisteet, joilla saadaan positiivinen tulos tässä testissä, ovat nisäkkäiden karsinogeeneja. Tämän testin ja karsinogeenisuuden välillä ei ole kuitenkaan täydellistä korrelaatiota. Korrelaatio riippuu kemiallisista ominaisuuksista, ja yhä useammat tutkimustulokset viittaavat siihen, että on olemassa karsinogeeneja, joita ei voida havaita tällä testillä, koska ne näyttävät vaikuttavan muiden mekanismien kuin suoran DNA-vaurion välityksellä.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2. MÄÄRITELMÄT

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleen yhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleen yhtymisenä samassa kohdassa.

▼B

Endoreduplikaatio: tapahtumasarja, jossa DNA:n kahdentumisen S-vaiheen tuma ei etene mitoosiin vaan aloittaa uuden S-vaiheen. Tämän seurauksena syntyy kromosomeja, joissa on 4, 8, 16, ... kromatidia.

Aukko: gap, akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys ja johon liittyy minimaalinen kromatidin (kromatidien) siirtymä.

Mitoosi-indeksi: suhdeluku, joka saadaan jakamalla metafaasissa olevien solujen määrä solupopulaatiossa todettujen solujen kokonaismäärällä; ilmoittaa solujen proliferaatioasteen kyseisessä solupopulaatiossa.

Numeerinen poikkeavuus: käytetyille soluille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

Polyploidia: haploidisen kromosomimäärän (*n*) esiintyminen moninkertaisena, muu kuin diploidinen kromosomimäärä (*3n, 4n* jne.).

Rakenteellinen poikkeavuus: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen meta-faasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina ja fragmentteina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijänvaihdoksina.

1.3 TESTIN PERIAATE

Soluviljelmät altistetaan tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Kun soluviljelmät on altistettu tutkittavalle aineelle, ne käsitellään etukäteen määrätyin välein metafaasin pysäyttävällä aineella (esim. Colcemid® tai kolkisiini), solut kerätään ja värjätään, ja metafaasissa olevat solut analysoidaan mikroskooppisesti kromosomipoikkeavuuksien havaitsemiseksi.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelu**

1.4.1.1 *Solut*

Testissä voidaan käyttää eri solulinjoja, solukantoja tai primaarisia soluviljelmiä, myös ihmisen soluja (esim. kiinanhamsterin fibroblasteja, ihmisen tai muun nisäkkään perifeerisen veren lymfosyyttejä).

1.4.1.2 *Kasvatusväliaineet ja viljelyolosuhteet*

Soluviljelmien ylläpidossa on käytettävä soveltuvia kasvatusalustoja ja inkubaatio-olosuhteita (kasvatusastiat, CO_2-pitoisuus, lämpötila ja kosteus). Pysyvistä solulinjoista ja kannoista on tarkistettava ajoittain modaalisen kromosomimäärän pysyvyys ja mahdollinen mykoplasmakontaminaatio. Kontaminoituneita viljelmiä ei pidä käyttää. Solujen normaali solusyklin kesto ja käytetyt viljelyolosuhteet on tunnettava.

1.4.1.3 *Soluviljelmien valmistelu*

Pysyvät solulinjat ja solukannat: solut kasvatetaan kantaviljelmistä, kylvetään kasvatusvälineeseen sellaiseen tiheyteen, että soluviljelmät eivät saavuta konfluenttisuutta ennen solujen keräämisajankohtaa, ja inkuboidaan 37 °C:ssa.

▼B

Lymfosyytit: antikoagulanteilla (esim. hepariinilla) käsiteltyä kokoverta tai terveiltä luovuttajilta saatuja erotettuja lymfosyyttejä lisätään mitogeenia (esim. fytohemagglutiniinia) sisältävään kasvatusväliaineeseen ja inkuboidaan 37 ºC:ssa.

1.4.1.4 *Metabolinen aktivaatio*

Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä sopivan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:11ä (6) (7) (8) (9) tai fenobarbitonin ja ß-naftoflavonin (10) (11) (12) yhdistelmällä käsiteltyjen jyrsijöiden maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria.

Postmitokondriaalisen jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue lopullisessa testiväliaineessa on 1-10 % v/v. Metabolinen aktivaatiojärjestelmä voi vaihdella sen mukaan, mihin kemiallisten aineiden ryhmään tutkittava aine kuuluu. Joissakin tapauksissa saattaa olla perusteltua käyttää useampaa kuin yhtä postmitokondriaalisen jakeen pitoisuutta.

Monilla kehitetyillä menetelmillä, kuten yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotetuilla solulinjoilla, joissa ilmentyy spesifisiä aktivaatioentsyymejä, saattaa olla endogeenista aktivaatiovaikutusta. Käytettyjen solulinjojen valinnan on oltava tieteellisesti perusteltua (esim. sytokromi P450 -isoentsyymin merkitys tutkittavan aineen metabolialle).

1.4.1.5 *Tutkittava aine / valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen solujen käsittelyä. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen solujen käsittelyä. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuotin/kantaja-aine ei saa olla sellainen, että sen voidaan epäillä reagoivan kemiallisesti tutkittavan aineen kanssa, eikä se saa vaikuttaa solujen elinkykyyn eikä S9-aktiivisuuteen. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Testattaessa aineita, jotka ovat epästabiileja vedessä, orgaanisten liuottimien tulisi olla vedettömiä. Vesi voidaan poistaa lisäämällä molekyylisiivilä.

1.4.2.2 *Altistuspitoisuudet*

Huomioonotettavia kriteerejä suurinta pitoisuutta määritettäessä ovat sytotoksisuus, liukoisuus testijärjestelmään ja pH:n tai osmolaliteetin muutokset.

Sytotoksisuus on määritettävä pääasiallisessa kokeessa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä käyttäen asianmukaisia solujen eheyden ja solukasvun indikaattoreita, kuten konfluenttisuuden astetta, elinkykyisten solujen määrää tai mitoosi-indeksiä. Sytotoksisuus ja liukoisuus saattaa olla hyödyllistä määrittää alustavassa kokeessa.

▼B

Vähintään kolmea analysoitavissa olevaa pitoisuutta on käytettävä. Mikäli sytotoksisuutta esiintyy, näiden pitoisuuksien on katettava alue, jossa suurimmalla pitoisuudella on maksimaalinen myrkkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkkyvaikutusta, mikä tarkoittaa yleensä sitä, että pitoisuudet voivat poiketa toisistaan enintään kertoimella 2–10. Solujen keräämisajankohtana suurimpaan pitoisuuteen tulisi liittyä merkittävä konfluenttisuuden asteen, solumäärän tai mitoosi-indeksin pieneneminen (kaikkien osalta yli 50 %). Mitoosi-indeksi on vain epäsuora sytotoksisten/sytostaattisten vaikutusten mitta, ja se riippuu altistuksesta kuluneesta ajasta. Mitoosi-indeksi hyväksytään kuitenkin suspensioviljelmissä, joissa muiden myrkkyvaikutusta mittaavien menetelmien käyttö saattaa olla hankalaa ja epäkäytännöllistä. Tietoja solusyklin kinetiikasta, kuten keskimääräistä generaatioaikaa (average generation time, AGT), voidaan käyttää täydentävinä tietoina. AGT on kuitenkin yleinen keskiarvo, joka ei aina paljasta hidastuneiden alapopulaatioiden olemassaoloa, ja vähäinenkin generaatioajan piteneminen voi siirtää poikkeavuuksien optimaalista toteamisaikaa hyvinkin paljon myöhemmäksi.

Soluille suhteellisen myrkyttömiä aineita tutkittaessa suurimman testattavan pitoisuuden on oltava 5 µl/ml, 5 mg/ml tai 0,01 M, sen mukaan, mikä näistä pitoisuuksista on pienin.

Testattaessa huonosti veteen liukenevia aineita, jotka ovat myrkyttömiä liukenemattoman pitoisuuden alittavina pitoisuuksina, suurimman käytetyn annoksen aikaansaaman pitoisuuden on ylitettävä liukoisuusraja lopullisessa kasvatusväliaineessa altistusjakson lopussa. Joissakin tapauksissa (esim. kun myrkkyvaikutus todetaan ainoastaan pienimmän liukenemattoman pitoisuuden ylittävillä pitoisuuksilla) on suositeltavaa testata useampia kuin yksi pitoisuus, jossa havaitaan näkyvää saostumista. Liukoisuus kannattaa arvioida sekä käsittelyn alussa että lopussa, sillä se voi muuttua koejärjestelmässä altistuksen aikana esimerkiksi solujen, S9:n, seerumin ym. vaikutuksesta. Liukenemattomuus voidaan havaita paljaalla silmällä. Sakan ei pitäisi vaikuttaa laskentaan.

1.4.2.3 *Negatiiviset ja positiiviset kontrollit*

Jokaisessa kokeessa on käytettävä rinnakkaisia positiivisia ja negatiivisia (liuotin tai kantaja-aine} kontrolleja, sekä metabolisen aktivaation läsnäollessa että ilman sitä. Metabolista aktivaatiota käytettäessä positiivisena kontrollina on käytettävä sellaista kemiallista ainetta, joka vaatii aktivaatiota mutageenisen vasteen aikaansaamiseksi.

Positiivisina kontrollialueina on käytettävä tunnettua klastogeenia altistustasoina, joiden voidaan odottaa aiheuttavan toistettavissa ja havaittavissa olevan lisääntymisen taustaan verrattuna, mikä osoittaa koejärjestelmän herkkyyden.

Positiivisen kontrollialueen pitoisuudet on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Metabolinen aktivaatio	Aine	CAS nro	EINECS nro
Ei eksogeenista metabolista aktivaatiota	metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3	200-625-0
	etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7

▼B

Metabolinen aktivaatio	Aine	CAS nro	EINECS nro
	etyylinitrosourea	759-73-9	212-072-2
	mitomysiini C	50-07-7	212-072-2
	4-nitrokinoliini-N-oksidi	56-57-5	200-281-1
Eksogeeninen metabolinen aktivaatio	Bentso[a]pyreeni	50-32-8	200-028-5
	syklofosfamidi syklofosfamidimonohydraatti	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Muita sopivia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää. Samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvan positiivisen kemiallisen kontrolliaineen käyttöä on harkittava, mikäli tällainen aine on käytettävissä.

Jokaisena solujen keräämisajankohtana on otettava näytteet myös negatiivisista kontrolleista, jotka koostuvat tutkittavaa ainetta sisältävässä kasvatusväliaineessa olevasta liuottimesta tai pelkästä kantajaaineesta ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja viljelmiä. Lisäksi on käytettävä myös käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos aikaisemmat tiedot kontrollista osoittavat, ettei valitulla liuottimella ole haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.4.3 **Testin suorittaminen**

1.4.3.1 *Altistaminen tutkittavalle aineelle*

Lisääntyvät solut altistetaan tutkittavalle aineelle metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa ja ilman sitä. Lymfosyyttien altistus on aloitettava noin 48 tunnin kuluttua mitogeenisesta stimulaatiosta.

1.4.3.2 Normaalisti jokaisesta pitoisuudesta tulisi tehdä kaksi rinnakkaista viljelmää, ja niiden käyttöä suositellaan erityisesti negatiivisissa/liuotinkontrolliviljelmissä. Mikäli aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että rinnakkaisviljelmien välillä on vain hyvin vähäisiä eroja (13) (14), yhden viljelyn käyttö kustakin pitoisuudesta saattaa olla hyväksyttävää.

Kaasumaisia tai haihtuvia aineita on testattava asianmukaisilla menetelmillä, kuten suljetuissa kasvatusastioissa (15) (16).

1.4.3.3 *Näytteiden keräämisajankohdat*

Ensimmäisessä kokeessa soluja on altistettava tutkittavalle aineelle sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä 3–6 tunnin ajan, ja näytteet kerätään suunnilleen 1,5 normaalin solusyklin kuluttua altistuksesta (12). Jos tässä menettelyssä saadaan negatiiviset tulokset sekä metabolisen aktivaation läsnäollessa että ilman sitä, on tehtävä uusi testi ilman aktivaatiota, ja altistusta on jatkettava yhtäjaksoisesti siihen asti, kun näytteet kerätään suunnilleen 1,5 normaalia solusykliä vastaavan ajan kuluttua. Tietyt kemialliset aineet saatetaan havaita helpommin, kun altistus/näytteenottoaika on pitempi kuin 1,5 solusykliä. Metabolisen aktivaation läsnäollessa saadut negatiiviset tulokset on vahvistettava tapauskohtaisesti. Ellei negatiivisten tulosten vahvistamista pidetä tarpeellisena, perustelut on esitettävä.

▼B

1.4.3.4 *Kromosomipreparaatti*

Soluviljelmiä käsitellään Colcemid®illa tai kolkisiinilla yleensä 1–3 tunnin ajan ennen näytteiden keräämistä. Jokaisen viljelmän näytteet kerätään ja käsitellään erikseen kromosomipreparaattien valmistusta varten. Kromosomipreparaattien valmistukseen kuuluu solujen hypotoninen käsittely, fiksointi ja värjäys.

1.4.3.5 *Analyysi*

Kaikki objektilasit, myös positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta. Koska fiksaatio johtaa usein joidenkin metafaasissa olevien solujen rikkoutumiseen ja kromosomien menettämiseen, lasketuissa soluissa tulisi olla sentromeerejä modaalista lukumäärää vastaava määrä ± 2 kaikissa solutyypeissä. Kustakin pitoisuudesta ja kontrollista olisi laskettava vähintään 200 hyvin levinnyttä metafaasia, jotka jakautuvat tasaisesti rinnakkaisviljelmien kesken, mikäli niitä käytetään. Lukumäärää voidaan pienentää, mikäli aberraatioita todetaan runsaasti.

Vaikka testillä pyritään ensisijaisesti toteamaan rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet, on tärkeää rekisteröidä myös polyploidia ja endoreduplikaatio, mikäli näitä esiintyy.

2. **TULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Kokeellinen yksikkö on solu, joten on arvioitava niiden solujen prosentuaalinen määrä, joissa on rakenteellinen kromosomipoikkeavuus (poikkeavuuksia). Erityyppiset rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet on lueteltava ja niiden lukumäärät ja esiintymistaajuudet altistetuissa viljelmissä ja kontrolliviljelmissä on mainittava. Aukot (gaps) rekisteröidään erikseen ja raportoidaan mutta niitä ei yleensä lasketa mukaan poikkeavuuksien kokonaistaajuuteen.

Lisäksi on rekisteröitävä kaikissa testiviljelmissä ja negatiivisissa kontrolliviljelmissä tehdyt samanaikaiset sytotoksisuusmittaukset pääasiallisissa kromosomipoikkeavuustesteissä.

Tulokset on ilmoitettava kutakin viljelmää kohti. Lisäksi on esitettävä yhteenveto kaikista tiedoista taulukkomuodossa.

Selvää positiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa. Epäselvät tulokset on selvitettävä jatkotestauksella mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa. Negatiivisten tulosten vahvistamisen tarvetta on käsitelty kohdassa 1.4.3.3. Jatkokokeissa on harkittava tutkimusparametrien modifiointia arvioitavien olosuhteiden laajentamiseksi. Mahdollisia modifioitavia tutkimusparametreja ovat pitoisuusvälit ja metaboliset aktivaatiojärjestelmät.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisten tulosten määrittämiseen on useita kriteerejä, kuten kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärän lisääntyminen, joka on riippuvainen tutkittavan aineen pitoisuudesta tai on toistettavissa. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (3) (13). Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

▼B

Polyploidisten solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että tutkittava aine pystyy estämään mitoottisia prosesseja ja aiheuttamaan numeerisia kromosomipoikkeavuuksia. Endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävien solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että tutkittava aine kykenee pysäyttämään solusyklin etenemisen (17) (18).

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä koejärjestelmässä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

In vitro -kromosomipoikkeavuustestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia viljellyissä nisäkkäiden somaattisissa soluissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa kromosomipoikkeavuuksia viljellyissä nisäkkäiden somaattisissa soluissa.

3. **RAPORTOINTI**

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Solut:

— solutyyppi ja solujen lähde,

— karyotyypin ominaisuudet ja käytetyn solutyypin soveltuvuus,

— mykoplasman puuttuminen, tarvittaessa,

— tiedot solusyklin pituudesta,

— verenluovuttajien sukupuoli, kokoveri vai eristetyt lymfosyytit, käytetty mitogeeni,

— siirtojen lukumäärä, tarvittaessa,

— soluviljelmän ylläpitomenetelmät, tarvittaessa,

— kromosomien modaalinen lukumäärä.

Koeolosuhteet:

— metafaasin estämiseen käytetty aine, sen pitoisuus ja solujen altistuksen kesto,

— pitoisuuksien ja soluviljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esim. sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset, mikäli tiedot ovat käytettävissä,

— kasvatusväliaineen koostumus, CO_2-pitoisuus, tarvittaessa,

▼B

— tutkittavan aineen pitoisuus,

— lisätyn kantaja-aineen ja tutkittavan aineen määrä,

— inkubaatiolämpötila,

— inkubaatioaika,

— altistuksen kesto,

— solutiheys kylvämisen aikana, tarvittaessa,

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus, myös sen hyväksyttävyyskriteerit,

— positiiviset ja negatiiviset kontrollit,

— objektilasien valmistelumenetelmät,

— kromosomipoikkeavuuksien laskentakriteerit,

— analysoitujen metafaasien lukumäärä,

— myrkkyvaikutuksen mittausmenetelmät,

— positiivisten, negatiivisten tai epäselvien tulosten kriteerit.

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit, esim. konfluenttisuuden aste, solusykliä koskevat tiedot, solumäärät, mitoosi-indeksi,

— saostumisen merkit,

— tiedot tutkittavaa ainetta sisältävän kasvatusväliaineen pH:sta ja osmolaliteetista, jos määritetty,

— kromosomipoikkeavuuksien, myös aukkojen, määrittely (gaps),

— kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ja kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ilmoitetaan kunkin altistetun viljelmän ja kontrolliviljelmän osalta erikseen,

— ploidian muutokset, jos niitä esiintyy,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— rinnakkaisten negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisten kontrollien tulokset,

— aikaisemmat tutkimustulokset negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUTTA**

(1) Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection,* Vol. 4, Hollaender, A., (ed) Plenum Press, New York and London, s. 1–29.

(2) Ishidate, M.Jr. and Sofumi, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress in Mutation Research,* Vol. 5, Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, s. 427–432.

▼B

(3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C. Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environs, Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), s. 1–175.

(4) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991).Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res., 257, s. 147–204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, Mutation Res., 268, s. 297–305.

(6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation* Res., 31, s. 347–364.

(7) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, s. 173–215.

(8) Natarajan, A.T., Tates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/-Carcinogens after Activation in a Microsomal System in Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation* Res., 37, s. 83–90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro, Mutation* Res., 66, s. 277–290.

(10) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis,* 7, s. 175–177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A. Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F.J. Fouts, J.R. Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing,* Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

(12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr.. Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, Mutation *Res.,* 312, s. 241–261.

(13) Richardson, C, Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.

(14) Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994), replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res,,* 312, s. 139–149.

(15) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/-HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents,* New York, Plenum, s. 91–103.

▼B

(16) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, E*nvironmental Mutagenesis,* 5, s. 795–801.

(17) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.,* 119, s. 403–413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.,* 43, s. 1362–1364.

▼B

B.11. **MUTAGEENISUUS — KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI NISÄKKÄIDEN LUUYTIMESSÄ *IN VIVO***

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkkäillä *in vivo* tehtävää kromosomipoikkeavuustestiä käytetään tutkittavan aineen aiheuttamien rakenteellisten kromosomipoikkeavuuksien osoittamiseen nisäkkäiden, yleensä jyrsijöiden, luuydinsoluissa (1) (2) (3) (4). Rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Polyploidian lisääntyminen saattaa osoittaa, että kemiallinen aine voi aiheuttaa numeerisia poikkeavuuksia. Kemiallisten mutageenien aiheuttamat poikkeavuudet ovat useimmiten kromatidityyppisiä, mutta myös kromosomityyppisiä mutaatioita esiintyy. Kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat ovat syynä moniin ihmisen geneettisiin sairauksiin, ja on saatu vakuuttavia todisteita siitä, että kromosomimutaatiot ja niihin liittyvä tapahtumat, jotka aiheuttavat muutoksia somaattisten solujen onkogeeneissä ja kasvunrajoitegeeneissä, ovat osallisina syövän synnyssä ihmisillä ja kokeellisissa järjestelmissä.

Tässä testissä käytetään rutiinimaisesti jyrsijöitä. Luuydin on tämän testin kohdekudos, sillä sen verisuonitus on hyvin runsasta ja se sisältää solupopulaation, jonka solusykli on nopea ja joka on helppo eristää ja prosessoida. Tätä menetelmää ei käytetä muilla lajeilla eikä muissa kohdekudoksissa.

Tämä kromosomipoikkeavuustesti soveltuu erityisesti mutageenisuuden vaaran arvioimiseen, sillä siinä voidaan ottaa huomioon tekijöitä, jotka liittyvät *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin, joskin näissä saattaa esiintyä eroja lajien ja kudosten välillä. *In vivo* -testiä voidaan käyttää myös *in vitro* -testissä havaitun mutageenisen vaikutuksen jatkotutkimuksena.

Jos on saatu viitteitä siitä, ettei tutkittava aine tai sen reaktiivinen metaboliitti pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä samassa kohdassa.

Endoreduplikaatio: tapahtumasarja, jossa DNA:n kahdentumisen S-vaiheen jälkeen tuma ei etene mitoosiin vaan aloittaa uuden S-vaiheen. Tämän seurauksena syntyy kromosomeja, joissa on 4, 8, 16, ... kromatidia.

Aukko: gap, akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys, ja johon liittyy minimaalinen kromatidin (kromatidien) siirtymä.

Numeerinen poikkeavuus: käytetyille soluille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

▼B

Polyploidia: haploidisen kromosomimäärän (*n*) esiintyminen moninkertaisena, muu kuin diploidinen kromosomimäärä (*3n, 4n* jne.).

Rakenteellinen poikkeavuus: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina ja fragmentteina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijänvaihdoksina.

1.3 TESTIN PERIAATE

Eläimet altistetaan tutkittavalle aineelle soveltuvaa altistusreittiä käyttäen ja lopetetaan sopivan ajan kuluttua altistuksesta. Ennen lopettamista eläimille annetaan ainetta, joka pysäyttää solunjakautumisen metafaasiin (esim. kolkisiinia tai Colcemid®ia). Tämän jälkeen luuydinsoluista tehdään kromosomipreparaatit ja ne värjätään, ja metafaasissa olevien solujen kromosomipoikkeavuudet analysoidaan.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelu**

1.4.1.1 *Eläinlajien valinta*

Yleisesti käytettyjä eläinlajeja ovat rotta, hiiri ja kiinanhamsteri, mutta myös muita soveltuvia nisäkäslajeja voidaan käyttää. Koeeläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä aikuisia eläimiä. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään ± 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta.

1.4.1.2 *Asuinolot ja ruokinta*

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B Yleisjohdannossa, mutta kosteustavoitteen on oltava 50–60 %.

1.4.1.3 *Eläinten valmistelu*

Terveet nuoret aikuiset eläimet jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti. Eläimiä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan.

1.4.1.4 *Annosten valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin niitä annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmistettava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli mahdollista.

▼B

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen testiin on otettava mukaan kumpaakin sukupuolta olevat rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrollien tulisi aiheuttaa rakenteellisia poikkeavuuksia *in vivo* -altistustasoilla, joiden odotetaan aiheuttavan poikkeavuuksien havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna. Positiivisten kontrollien annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Positiivinen kontrolli voidaan antaa eri reittiä kuin tutkittava aine ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Positiivisina kontrolleina tulisi käyttää samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvia aineita, mikäli mahdollista. Esimerkkejä positiivisista kontrolleista:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
Etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
Etyylinitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomysiini C	50-07-7	200-008-6
Syklofosfamidi Syklofosfamidimonohydraatti	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietyleenimelamiini	51-18-3	200-083-5

Pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta saaneista negatiivisista kontrolleista, joita muuten on käsitelty samalla tavoin kuin koeryhmiä, on otettava näytteet jokaisella näytteenottokerralla, paitsi jos aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että eläinten väliset erot ja vaihtelut kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistaajuudessa ovat hyväksyttävällä tasolla. Jos negatiivisista kontrolleista otetaan vain yksi näyte, se tulisi ottaa ensimmäisellä näytteenottokerralla. Lisäksi on käytettävä myös käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos kontrolleilla aikaisemmin tehdyt tutkimukset tai julkaistut tulokset osoittavat, että valittu liuotin/kantaja-aine ei aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Jokaisessa koe- ja kontrolliryhmässä on oltava vähintään 5 analysoitavissa olevaa eläintä kumpaakin sukupuolta. Vain toista sukupuolta voidaan käyttää, mikäli tutkimusajankohtana on käytettävissä samalla eläinlajilla samaa altistusreittiä käyttäen tehtyjä tutkimuksia, joiden tulokset osoittavat, ettei myrkkyvaikutuksessa ole huomattavia eroja sukupuolten välillä. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemialliselle aineelle voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Tutkittavat aineet tulisi antaa mieluiten kerta-annoksena. Ne voidaan kuitenkin antaa myös jaettuina annoksina, eli kahtena altistuksena saman päivän aikana vain muutaman tunnin välein, mikä helpottaa suurten ainemäärien antamista. Muut annosteluohjelmat on perusteltava tieteellisesti.

▼B

Näytteet on otettava kahtena ajankohtana saman päivän aikana altistuksen jälkeen. Jyrsijöillä ensimmäisen näytteenottovälin pituus on 1,5 normaalia solusykliä (solusyklin pituus on normaalisti 12–18 tuntia) altistuksen jälkeen. Koska tutkittavan aineen soluunottoon ja metaboloitumiseen kuluva aika ja sen vaikutus solusyklin kinetiikkaan voi muuttaa kromosomipoikkeavuuksien optimaalista havaitsemisajankohtaa, myöhempi näyte tulisi kerätä 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä näytteestä. Jos tutkittavaa ainetta annetaan pitempään kuin yhden päivän ajan. yksi näyte on otettava 1,5 normaalin solusyklin kuluttua viimeisestä altistusajankohdasta.

Ennen lopettamista eläimille annetaan injektiona vatsaonteloon sopiva annos ainetta, joka pysäyttää solut metafaasivaiheeseen (esim. Colcemid®ia tai kolkisiinia). Eläimistä otetaan näytteet sopivan ajan kuluttua tämän jälkeen. Hiirillä tämä väli on noin 3–5 tuntia; kiinanhamstereilla se on noin 4–5 tuntia. Solut kerätään luuytimestä ja analysoidaan kromosomipoikkeavuuksien toteamiseksi.

1.5.3 **Annostasot**

Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää (5). Mikäli myrkkyvaikutuksia esiintyy, ensimmäiseen näytteenottoajankohtaan asti käytetään kolmea annostasoa. Näistä suurimmalla annoksella on oltava maksimaalinen myrkkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkkyvaikutusta. Myöhemmän näytteenottoajankohdan edellä voidaan käyttää vain suurinta annosta. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisyysoireita, että samaa annosteluohjelmaa käytettäessä suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan. Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit), saattavat edellyttää toisenlaisia annoksenmäärityskriteerejä, ja niitä pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkyllisyyteen viittaavia muutoksia luuytimessä (esim. mitoosi-indeksi pienenee yli 50 %).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2 000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivän aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Pitempään kestävissä tutkimuksissa raja-annos on 2 000 mg painokiloa kohti vuorokaudessa, jos altistusta jatketaan enintään 14 vuorokautta, ja 1 000 mg/kg/vrk, jos altistus kestää yli 14 vuorokautta. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostasojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä tai injektiona vatsaonteloon. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Koe-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

▼B

1.5.6 **Kromosomipreparaatin valmistus**

Luuydintä kerätään heti eläinten lopettamisen jälkeen, käsitellään hypotonisella liuoksella ja fiksoidaan. Tämän jälkeen solut levitetään objektilaseille ja värjätään.

1.5.7 **Analyysi**

Mitoosi-indeksi on määritettävä sytotoksisuuden mittana vähintään 1 000 solusta eläintä kohti kaikista tutkittavalle aineelle altistetuista eläimistä (myös positiivisista kontrolleista) ja altistamattomista negatiivisista kontrollieläimistä.

Jokaisesta eläimestä on analysoitava vähintään 100 solua. Määrä voi olla pienempi, mikäli havaitaan runsaasti poikkeavuuksia. Kaikki objektilasit, myös ne, joilla on positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta. Koska objektilasien valmistelu johtaa usein joidenkin metafaasissa olevien solujen rikkoutumiseen ja kromosomien menettämiseen, sentromeerien lukumäärän lasketuissa soluissa on vastattava lukua 2n ± 2.

2. **TULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Yksittäisten eläinten tulokset on esitettävä taulukkomuodossa. Kokeellinen yksikkö on eläin. Jokaisesta eläimestä on arvioitava laskettujen solujen lukumäärä, poikkeavuuksien lukumäärä solua kohti ja niiden solujen prosentuaalinen osuus, joissa on yksi tai useampia rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia. Erityyppiset rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet on lueteltava ja niiden lukumäärä ja esiintymistaajuus on ilmoitettava koe- ja kontrolliryhmien osalta. Aukot (gaps) rekisteröidään erikseen ja raportoidaan, mutta niitä ei yleensä lasketa mukaan kromosomipoikkeavuuksien kokonaistaajuuteen. Ellei viitteitä sukupuolten välisistä vaste-eroista ole havaittavissa, molempien sukupuolten tiedot voidaan yhdistää tilastollista analyysiä tehtäessä.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen suhteellisen lukumäärän annoksesta riippuva suureneminen tai kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärän selvä suureneminen yksittäisessä annosryhmässä yhdellä näytteenottokerralla. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (6). Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa. Epäselviä tuloksia on selkeytettävä jatkotestauksella mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa.

Polyploidian lisääntyminen saattaa osoittaa, että tutkittava aine pystyy aiheuttamaan numeerisia kromosomipoikkeavuuksia. Endoreduplikaation lisääntyminen saattaa osoittaa, että tutkittava aine kykenee pysäyttämään solusyklin etenemisen (7) (8).

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

▼B

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tulosten pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi tehtyjen kokeiden lukumäärästä riippumatta.

In vivo -kromosomipoikkeavuustestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin luuytimessä. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin luuytimessä.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä yleiseen verenkiertoon tai erityisesti kohdekudokseen (esim. systeeminen toksisuus) on pohdittava.

3. RAPORTOINTI

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.,

— eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

Koeolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollit,

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset,

— annostasojen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen valmistelun yksityiskohdat,

— tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat,

— antotavan valintaperusteet,

— menetelmät, joilla on vahvistettu tutkittavan aineen pääsy yleiseen verenkiertoon tai kohdekudokseen, tarvittaessa,

— ravintoon/juomaveteen sekoitetun tutkittavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk), tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta,

— yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteidenkeräysohjelmasta,

— myrkkyvaikutuksen mittausmenetelmät,

▼B

— metafaasin pysäyttämisessä käytetty aine, sen pitoisuus ja käsittelyn kesto,

— objektilasien valmistusmenetelmät,

— kromosomipoikkeavuuksien laskentakriteerit,

— analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti,

— kriteerit, joiden perustella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— mitoosi-indeksi,

— kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ja lukumäärä, ilmoitettava jokaisen eläimen osalta erikseen,

— kromosomipoikkeavuuksien kokonaismäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat,

— kromosomipoikkeavuuksia sisältäneiden solujen lukumäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat,

— ploidian muutokset, jos niitä esiintyy,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista.

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— rinnakkaisen negatiivisen kontrollin tulokset,

— aikaisemmat negatiivisesta kontrollista saadut tutkimustulokset sekä vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat,

— rinnakkaisen positiivisen kontrollin tulokset.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUTTA**

(1) Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, S. Venitt and J.M. Party (eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., s. 275–306.

(2) Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.,* 189, s. 57–165.

(3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D.J. Kirkland (Ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

(4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, K, Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res.,* s. 312, 305–312.

(5) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis,* 7, s. 313–319.

▼B

(6) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge, s. 184–232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest. *Mutation Res.,* 11 9, s. 403–413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.,* 43, s. 1362–1364.

▼B

B.12. MUTAGEENISUUS — MIKROTUMATESTI NISÄKKÄÄN PUNASOLUISSA *IN VIVO*

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkkäiden *in vivo* -mikrotumatestiä käytetään tutkittavan aineen aiheuttamien kromosomivaurioiden tai mitoosilaitteen vaurioiden toteamiseen erytroblasteissa analysoimalla eläinten, yleensä jyrsijöiden, luuytimestä kerättyjä punasoluja ja/tai perifeerisiä verisoluja.

Mikrotumatestin tarkoituksena on tunnistaa sellaisia sytogeneettisiä vaurioita aiheuttavat aineet, jotka johtavat hitaasti liikkuvia (lagging) kromosomifragmentteja tai kokonaisia kromosomeja sisältävien mikrotumien muodostumiseen.

Kun luuytimen erytroblasti kehittyy polykromaattiseksi punasoluksi, päätuma irtoaa solusta, ja mahdollinen muodostunut mikrotuma saattaa jäädä muutoin tumattomaan solulimaan. Päätuman puuttuminen helpottaa mikrotumien havaitsemista näissä soluissa. Mikrotumaisten polykromaattisten punasolujen suurentunut esiintymistaajuus altistetuilla eläimillä on osoitus tutkittavan aineen aiheuttamasta kromosomivauriosta.

Tässä testissä käytetään rutiinimaisesti jyrsijöiden luuydintä, sillä polykromaattiset punasolut muodostuvat luuytimessä. Mikrotumaiset epäkypsät (polykromaattiset) punasolut voidaan mitata yhtä hyvin perifeerisestä verestä miltä tahansa eläinlajilta, jonka perna ei kykene poistamaan mikrotumaisia punasoluja tai jonka on todettu olevan riittävän herkkä rakenteellisia tai numeerisia kromosomipoikkeavuuksia aiheuttavien aineiden osoittamiseen. Mikrotumien erottamisessa voidaan käyttää useita kriteerejä. Näitä ovat kinetokorin tai sentromeerisen DNA:n osoittaminen mikrotumissa tai puuttuminen niistä. Mikrotumaisten epäkypsien (polykromaattisten) punasolujen esiintymistaajuus on pääasiallinen tulos. Perifeerisen veren kypsien (normokromaattisten) punasolujen lukumäärää, jossa esiintyy mikrotumia tietyssä määrässä kypsiä punasoluja, voidaan myös käyttää analyysin tuloksena, kun eläimet saavat tutkittavaa ainetta jatkuvasti vähintään 4 viikon ajan.

Tämä nisäkkäiden *in vivo* -mikrotumatesti soveltuu erityisesti mutageenisuuden vaaran arvioimiseen, sillä siinä voidaan ottaa huomioon tekijöitä, jotka liittyvät *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin, joskin näissä saattaa esiintyä eroja eri lajeilla, eri kudoksissa ja geneettisissä tuloksissa. *In vivo* -analyysi on hyödyllinen myös *in vitro* -koejärjestelmässä havaitun mutageenisen vaikutuksen jatkotutkimuksena.

Jos on saatu viitteitä siitä, että testattava aine, tai sen reaktiivinen metaboliitti, ei pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT

Sentromeeri (kinetokori): Kromosomin alue (alueita), joihin sukkularihmat ovat kiinnittyneet solunjakautumisen aikana. Tähän perustuu tytärkromosomien järjestäytynyt siirtyminen tytärsolujen napoihin.

Mikrotumat: Pieniä solun päätumasta erillisiä ja niiden rinnalla esiintyviä tumia, jotka muodostuvat mitoosin (meioosin) telofaasin aikana hitaasti liikkuvista (lagging) kromosomikappaleista tai kokonaisista kromosomeista.

Normokromaattinen punasolu: Kypsä punasolu, josta puuttuvat ribosomit ja joka voidaan erottaa polykromaattisista punasolujen esiasteista ribosomiselektiivisillä väriaineilla.

Polykromaattinen punasolu: Punasolun esiaste, kehityksen välivaiheessa oleva (epäkypsä) punasolu, jossa on edelleen ribosomeja ja joka voidaan tämän perusteella erottaa kypsistä, normokromaattisista punasoluista ribosomiselektiivisillä väriaineilla.

1.3 TESTIN PERIAATE

Eläimet altistetaan tutkittavalle aineelle sopivaa antotapaa käyttäen. Jos käytetään luuydintä, eläimet lopetetaan sopivan ajan kuluttua altistuksesta, luuydin poistetaan ja preparaatit valmistetaan ja värjätään (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Käytettäessä perifeeristä verta verinäytteet otetaan sopivina ajankohtina altistuksen jälkeen, tehdään sivelyvalmisteet ja värjätään (4) (8) (9) (10). Perifeeristä verta käyttävissä tutkimuksissa viimeisen altistuksen ja solujen keräämisen välisen ajan tulisi olla mahdollisimman lyhyt. Preparaatit analysoidaan mikrotumien toteamiseksi.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelu**

1.4.1.1 *Eläinlajin valinta*

Luuydintä käytettäessä hiiret tai rotat ovat suositeltavia koe-eläimiä, mutta myös muita soveltuvia nisäkäslajeja voidaan käyttää. Perifeerisestä verestä tehtävissä tutkimuksissa koe-eläimiksi suositellaan hiiriä. Koe-eläimenä voidaan kuitenkin käyttää mitä tahansa sopivaa nisäkäslajia, jonka perna ei poista mikrotumaisia punasoluja tai jonka on osoitettu olevan riittävän herkkä rakenteellisia tai numeerisia poikkeavuuksia aiheuttavien aineiden toteamiseen. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä eläimiä. Tutkimuksen alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään ± 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta.

1.4.1.2 *Asuinolot ja ruokinta*

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B Yleisjohdannossa mainitut, mutta kosteustavoitteen on oltava 50–60 %.

▼B

1.4.1.3 *Eläimen valmistelu*

Terveet nuoret aikuiset eläimet jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti. Eläimiä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä.

1.4.1.4 *Annosten valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin niitä annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli mahdollista.

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen testiin on otettava mukaan kumpaakin sukupuolta olevat rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrollien tulisi aiheuttaa mikrotumia *in vivo* -altistustasoilla, joiden odotetaan aiheuttavan havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna. Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Positiivinen kontrolliaine voidaan antaa eri reittiä pitkin kuin tutkittava aine ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Lisäksi positiivisina kontrolleina tulisi käyttää samaan kemiallisten aineiden ryhmän kuuluvia aineita, mikäli mahdollista. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
Etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
N-etyyli-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomysiini C	50-07-7	200-008-6
Syklofosfamidi Syklofosfamidimonohydraatti	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietyleenimelamiini	51-18-3	200-083-5

▼B

Negatiivisista kontrolleista, jotka ovat saaneet pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta ja joita muuten on käsitelty samalla tavoin kuin koeryhmiä, on otettava näytteet jokaisella näytteenottokerralla, paitsi jos aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että eläinten väliset erot ja vaihtelut mikrotumia sisältävien solujen esiintymistaajuudessa ovat hyväksyttävällä tasolla. Jos negatiivisista kontrolleista otetaan vain yksi näyte, se tulisi ottaa ensimmäisellä näytteenottokerralla. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos aikaisemmat kontrolleista tehdyt tutkimukset ja julkaistut tulokset osoittavat, ettei valittu liuotin/kantaja-aine aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

Jos käytetään perifeeristä verta, rinnakkaiseksi negatiiviseksi kontrolliksi voidaan hyväksyä myös ennen altistusta otettu näyte, mutta vain lyhytaikaisissa perifeerisestä verestä tehtävissä testeissä (esim. 1-3 altistusta), mikäli saadut tulokset ovat aikaisempiin kontrollista saatuihin tutkimustuloksiin perustuvalla odotetulla alueella.

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Jokaisessa koe- ja kontrolliryhmässä on oltava vähintään 5 analysoitavissa olevaa eläintä kumpaakin sukupuolta (11). Vain toista sukupuolta voidaan käyttää, mikäli tutkimusajankohtana on käytettävissä samalla eläinlajilla ja samaa antoreittiä käyttämällä tehtyjä tutkimuksia, joiden tulokset osoittavat, ettei myrkkyvaikutuksessa ole huomattavia eroja sukupuolten välillä. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemialliselle aineelle voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Mitään standardia altistusohjelmaa (kuten 1, 2 tai useampia altistuksia 24 tunnin välein) ei voida suositella. Pitempien altistusohjelmien aikana kerätyt näytteet ovat hyväksyttäviä, mikäli positiivinen vaikutus on osoitettu tässä tutkimuksessa tai negatiivisessa tutkimuksessa on osoitettu myrkkyvaikutusta tai raja-annosta on käytetty ja annostelua on jatkettu näytteenoton ajankohtaan asti. Tutkittavat aineet voidaan antaa myös jaettuina annoksina, eli kaksi altistuskertaa samana päivänä muutaman tunnin välein, mikä helpottaa suurten ainemäärien antamista.

Testi voidaan tehdä kahdella tavalla:

a) Eläimet altistetaan tutkittavalle aineelle yhden kerran. Luuydinnäytteitä otetaan vähintään kaksi kertaa siten, että ensimmäinen näyte otetaan aikaisintaan 24 tunnin kuluttua altistuksesta ja viimeinen viimeistään 48 tunnin kuluttua altistuksesta ja näytteenottokertojen välillä on sopiva väli. Mikäli näytteitä otetaan aikaisemmin kuin 24 tunnin kuluttua, perustelut on esitettävä. Perifeerisestä verestä otetaan näytteitä vähintään kaksi kertaa siten, että ensimmäinen näyte otetaan aikaisintaan 36 tunnin kuluttua altistuksesta ja seuraavat sopivan ajan kuluttua siitä, kuitenkin viimeistään 72 tunnin kuluttua altistuksesta. Mikäli positiivinen vaste havaitaan yhden näytteenottokerran jälkeen, lisänäytteitä ei tarvita.

▼B

b) Jos päivittäisiä altistuskertoja on 2 tai enemmän (esim. kaksi tai useampia altistuksia 24 tunnin välein), näytteet on kerättävä luuytimestä kerran 18-24 tunnin kuluttua viimeisestä altistuksesta ja perifeerisestä verestä kerran 36–48 tunnin kuluttua viimeisestä altistuksesta (12).

Tarvittaessa voidaan näytteitä ottaa muinakin ajankohtina.

1.5.3 **Annostasot**

Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ci ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää (13). Mikäli myrkkyvaikutuksia esiintyy, ensimmäiseen näytteenottoajankohtaan asti käytetään kolmea annostasoa. Näistä suurimmalla annoksella on oltava maksimaalinen myrkkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkkyvaikutusta. Myöhemmän näytteenottoajankohdan edellä voidaan käyttää vain suurinta annosta. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisyysoireita, että samaa annosteluohjelmaa käytettäessä suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan. Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit) saattavat edellyttää toisenlaisia annoksenmääritykskriteerejä, ja niitä pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkyllisyyteen viittaavia muutoksia luuytimessä (esim. punasolujen esiasteiden osuuden pieneneminen punasolujen kokonaismäärästä luuytimessä tai perifeerisessä veressä).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2 000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivän aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Pitempään kestävissä tutkimuksissa raja-annos on 2 000 mg painokiloa kohti vuorokaudessa, jos altistusta jatketaan enintään 14 vuorokautta, ja 1 000 mg/kg/vrk, jos altistus kestää yli 14 vuorokautta. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostasojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä tai injektiona vatsaonteloon. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Koe-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

▼B

1.5.6 **Luuydin-/veripreparaatit**

Luuydinsolut kerätään yleensä reisiluista tai sääriluista heti koe-eläinten lopettamisen jälkeen. Solut otetaan reisi- tai sääriluista, niistä tehdään preparaatit ja ne värjätään vakiintuneilla värjäysmenetelmillä. Perifeerinen veri kerätään häntälaskimosta tai muusta sopivasta verisuonesta. Verisolut värjätään heti supravitaaliväreillä (8) (9) (10) tai niistä tehdään ensin sivelyvalmisteet ja värjätään sen jälkeen. DNA-spesifisten väriaineiden käyttö [esim. akridiinioranssi (14) tai Hoechst 33258 plus pyroniini-Y (15)] voi eliminoida joitakin ei-DNA-spesifisen väriaineen käyttöön liittyviä artefakteja. Tämä etu ei sulje pois tavanomaisten väriaineiden (esim. Giemsa) käyttöä. Myös muita järjestelmiä [esim. selluloosapylväitä tumallisten solujen poistamiseksi (16)] voidaan käyttää, mikäli nämä menetelmät on laboratoriossa osoitettu riittävän toimiviksi mikrotumapreparaattien valmistamisessa.

1.5.7 **Analyysi**

Punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä (esiasteet + kypsät punasolut) määritetään jokaisen eläimen osalta erikseen laskemalla yhteensä vähintään 200 punasolua luuytimestä ja 1 000 punasolua perifeerisestä verestä (17). Kaikki objektilasit, myös ne, joilla on positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta. Vähintään 2 000 punasolun esiastetta lasketaan eläintä kohti mikrotumaisten punasolujen esiasteiden esiintymistiheyden määrittämistä varten. Lisätietoja voidaan saada laskemalla mikrotumat kypsistä punasoluista. Objektilaseja analysoitaessa punasolujen esiasteiden osuuden punasolujen kokonaismäärästä tulisi olla vähintään 20 % kontrolliarvosta. Kun koe-eläimille annetaan tutkittavaa ainetta jatkuvasti 4 viikon ajan tai pitempään, voidaan laskea myös vähintään 2 000 kypsää punasolua eläintä kohti mikrotumien esiintymistiheyden toteamiseksi. Automaattiset analyysijärjestelmät (kuva-analyysi ja solususpensioiden virtaussytometria) ovat hyväksyttäviä vaihtoehtoja manuaaliselle arvioinnille, mikäli ne perustellaan ja validoidaan asianmukaisesti.

2. **TULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Yksittäisten eläinten tulokset on esitettävä taulukkomuodossa. Kokeellinen yksikkö on eläin. Punasolujen esiasteiden laskettu määrä, mikrotumaisten punasolujen esiasteiden lukumäärä ja punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä on lueteltava kunkin analysoidun eläimen osalta erikseen. Mikäli eläimille annetaan tutkittavaa ainetta jatkuvasti 4 viikon ajan tai pitempään, myös kypsien punasolujen tiedot on ilmoitettava, mikäli niitä on kerätty. Punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä ja, jos katsotaan aiheelliseksi, mikrotumaisten punasolujen prosentuaalinen määrä ilmoitetaan jokaisen eläimen osalta. Ellei viitteitä sukupuolten välisistä vaste-eroista ole havaittavissa, molempien sukupuolten tiedot voidaan yhdistää tilastollista analyysiä tehtäessä.

▼B

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten mikrotumaisten solujen lukumäärän annoksesta riippuva suureneminen tai mikrotumaisten solujen lukumäärän selvä suureneminen yksittäisessä annosryhmässä yhdellä näytteenottokerralla. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (18) (19). Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa. Epäselviä tuloksia on selkeytettävä jatkotestauksella, mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa.

Testattava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Mikrotumatestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa mikrotumia, jotka ovat seurausta kromosomivauriosta tai mitoosilaitteen vauriosta testatun lajin punasoluissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa mikrotumia testattujen lajien punasolujen esiasteissa.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä yleiseen verenkiertoon tai erityisesti kohdekudokseen (esim. systeeminen toksisuus) on pohdittava.

3. **RAPORTOINTI**

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.,

— eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

Koeolosuhteet:

— positiivisia ja negatiivisia (kantaja-aine/liuotin) kontrolleja koskevat tiedot,

— raja-annostutkimuksen tulokset, jos tehty,

▼B

— annostasojen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen valmistelujen yksityiskohdat,

— tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat,

— antotavan valintaperusteet,

— menetelmät, joilla on vahvistettu tutkittavan aineen pääsy yleiseen verenkiertoon tai kohdekudokseen, tarvittaessa,

— ravintoon/juomaveteen sekoitetun tutkittavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk), tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta,

— yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteenotto-ohjelmasta,

— objektilasien valmistusmenetelmät,

— myrkkyvaikutuksen mittausmenetelmät,

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden laskentakriteerit,

— analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti,

— kriteerit, joiden perustella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— punasolujen esiasteiden osuus punasolujen kokonaismäärästä,

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden lukumäärä, ilmoitetaan erikseen jokaisesta eläimestä,

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden keskiarvo ± keskihajonta ryhmää kohti,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista,

— käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät,

— samanaikaiset ja aikaisemmat negatiivisilla kontrolleilla saadut tulokset,

— rinnakkaisen positiivisen kontrollin tiedot.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUTTA**

(1) Heddle, J.A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.,* 18, s. 187–190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.,* 31, s. 9–15.

(3) Heddle, J.A., Salamonc, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, s. 61–118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency GeneTox Program, *Mutation Res.,* 239, s. 29–80.

▼B

(5) MacGregor, J.T., Schlegel, R., Choy, W.N. and Wehr, C.M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology,* ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, s. 555–558.

(6) MacGregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.,* 189, s. 103–112.

(7) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R. and Shelby, M.E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, s. 513–522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.,* 245, s. 245–249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridime Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS, *Mutation Res.,* 278, s. 83–98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995), Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis,* 10, s. 53–159.

(11) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchicrotti, F., Romagna, F., Shimada, H. Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.,* 312, s. 293–304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral micronucleus test, *Mutagenesis,* 10, s. 313–319.

(13) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis, 7,* s. 313–319.

(14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.,* 120, s. 241–247.

(15) MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.,* 120, s. 269–275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.,* 213, s. 91–104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.,* 347, s. 97–99.

▼B

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, in: D.J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

(19) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D.J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184–232.

▼B

B.13/14. **MUTAGEENISUUS — TAKAISINMUTAATIOTESTI BAKTEEREILLA**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 471 Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Bakteereilla tehtävässä takaisinmutaatiotestissä käytetään *Salmonella typhimurium*- ja *Escherichia coli* -bakteereiden aminohappoja vaativia kantoja sellaisten pistemutaatioiden havaitsemiseksi, joihin liittyy DNA:n yhden tai useamman emäsparin korvautuminen, ylimäärä tai deleetio (1) (2) (3). Tämän bakteereilla tehtävän takaisinmutaatiotestin periaate on, että se paljastaa mutaatiot, jotka korjaavat testikannassa olevat mutaatiot ja palauttavat bakteerien toiminnallisen kyvyn syntetisoida essentiaalista aminohappoa. Revertantit bakteerit tunnistetaan siitä, että ne pystyvät kasvamaan, vaikka testibakteerikannan ennen takaisinmutaatiota tarvitsema aminohappo puuttuu.

Pistemutaatiot aiheuttavat monia ihmisen geneettisiä sairauksia, ja on saatu vakuuttavia todisteita siitä, että somaattisten solujen onkogeeneissä ja kasvunrajoitegeeneissä olevat pistemutaatiot ovat osallisina ihmisten ja koe-eläinten kasvainten muodostumisessa. Bakteereilla tehtävä takaisinmutaatiotesti on nopea, edullinen ja suhteellisen helposti toteutettava testi. Monilla testikannoilla on useita ominaisuuksia, joiden ansiosta ne osoittavat herkästi mutaatiot. Näitä ovat esimerkiksi herkästi reagoivat DNA-jaksot takaisinmutaatiokohdissa, solujen lisääntynyt läpäisevyys suurille molekyyleille ja DNA:n korjausjärjestelmien eliminoituminen tai virheille alttiiden DNA:n korjausprosessien lisääntyminen. Testikantojen spesifisyys voi tuottaa hyödyllistä tietoa genotoksisten aineiden aiheuttamien mutaatioiden tyypistä. Käytettävissä on hyvin laaja tietokanta bakteerien takaisinmutaatiotestien tuloksista erittäin monissa rakenteissa, ja vakiintuneita menetelmiä on kehitetty fysikaalis-kemiallisilta ominaisuuksiltaan erilaisten kemiallisten aineiden, myös haihtuvien yhdisteiden, testaamista varten.

Ks. myös yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Takaisinmutaatiotesti joko *Salmonella typhimurium*- tai *Escherichia coli* -bakteereilla osoittaa aminohappoa vaativassa kannassa (edellisessä histidiini ja jälkimmäisessä tryptofaani) mutaation, jonka seurauksena syntyy ulkopuolisesta aminohapon saannista riippumaton kanta.

Emäsparin korvautumista aiheuttavat mutageenit ovat aineita, jotka aiheuttavat emäksen vaihtumisen DNA:ssa. Takaisinmutaatiotestissä tämä vaihtuminen saattaa tapahtua alkuperäisen mutaation kohdassa tai jossakin muussa bakteerigenomin kohdassa.

Lukukehyksensiirtomutageenit ovat aineita, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin ylimäärän tai vajauksen DNA:ssa, mikä muuttaa lukukehystä (reading frame) RNA:ssa.

▼B

1.3 ALUSTAVAT VALMISTELUT

Bakteereilla tehtävässä takaisinmutaatiotestissä käytetään prokaryoottisoluja, jotka poikkeavat nisäkässoluista soluunoton, metabolian, kromosomirakenteen ja DNA:n korjautumisprosessien suhteen. *In vitro* -testit vaativat yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää. *In vitro* -metaboliset aktivaatiojärjestelmät eivät pysty täysin jäljittelemään nisäkässolujen *in vivo* -olosuhteita. Testistä ei sen vuoksi voida suoraan päätellä aineen mutageenisuutta ja karsinogeenisuutta nisäkkäillä.

Bakteereilla tehtävää takaisinmutaatiotestiä käytetään yleisesti genotoksisuuden, ja varsinkin pistemutaatioita aiheuttavan vaikutuksen, alustavana seulontamenetelmänä. Laaja tietokanta on osoittanut, että monilla kemiallisilla aineilla, joilla saadaan positiivinen tulos tässä tutkimuksessa, todetaan mutageenista vaikutusta myös muissa tutkimuksissa. On myös esimerkkejä mutageenisista aineista, joita ei voida todeta tällä testillä. Nämä epäonnistumiset voivat johtua todetun tulostapahtuman spesifisestä luonteesta, metabolisen aktivaation eroista tai aineen erilaisesta biologisesta hyödynnettävyydestä. Toisaalta takaisinmutaatiotestin herkkyyttä lisäävät tekijät voivat johtaa mutageenisen aktiivisuuden liialliseen stimulaatioon.

Bakteereilla tehtävä takaisinmutaatiotesti ei välttämättä sovellu tiettyjen kemiallisten aineryhmien testaamiseen. Tällaisia ovat esimerkiksi voimakkaasti bakterisidiset yhdisteet (esim. tietyt antibiootit) ja aineet, joiden arvellaan (tai tiedetään) vaikuttavan erityisesti nisäkässolun kahdentumisjärjestelmään (esim. jotkut topoisomeraasin estäjät ja jotkut nukleosidianalogit). Nisäkkäillä tehtävät mutaatiotestit saattavat soveltua paremmin näihin tapauksiin.

Vaikka monet tässä testissä positiivisen tuloksen antavat kemialliset aineet ovat karsinogeenisia nisäkkäillä, korrelaatio ei ole ehdoton. Se riippuu aineryhmän kemiallisista ominaisuuksista, eikä kaikkia karsinogeeneja voida todeta tällä testillä, koska ne vaikuttavat muiden, ei-genotoksisten mekanismien tai bakteerisoluista puuttuvien mekanismien välityksellä.

1.4 TESTIN PERIAATE

Bakteerisolususpensiot altistetaan tutkittavalle aineelle eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa tai ilman sitä. Maljainkorporoitumismenetelmässä nämä suspensiot sekoitetaan overlay-agariin ja levitetään heti minimaalisen kasvualustan pinnalle. Preinkubaatiomenetelmässä tutkittavaa ainetta sisältävää seosta inkuboidaan, minkä jälkeen se sekoitetaan overlay-agariin ennen kuin se levitetään minimaalisen kasvualustan pinnalle. Molemmissa menetelmissä revertantit pesäkkeet lasketaan 2–3 päivän inkubaatioajan jälkeen ja niiden määrää verrataan spontaanien revertanttien pesäkkeiden määrään pelkkää liuotinta sisältävissä kontrollimaljoissa.

Takaisinmutaatiotesti bakteereilla voidaan tehdä useilla eri menetelmillä. Yleisesti käytettyjä ovat maljainkorpo-roitumismenetelmä (1) (2) (3) (4), preinkubaatiomenetelmä (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuaatiomenetelmä (9) (10) ja suspensiomenetelmä (11). Kaasujen ja höyryjen testaamiseen käytettäviä muunnelmia on myös kuvattu (12).

▼B

Tässä menetelmässä kuvataan pääasiassa maljainkorporoitumis- ja preinkubaatiomenetelmiä. Niillä molemmilla voidaan tehdä kokeita sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Jotkut aineet voidaan havaita tehokkaammin preinkubaatiomenetelmällä. Nämä kuuluvat sellaisiin kemiallisten aineiden ryhmiin, joihin kuuluu lyhytketjuisia alifaattisia nitrosoamiineja, kaksiarvoisia metalleja, aldehydejä, atsovärejä ja diatsoyhdisteitä, pyrollitsidiinialkaloideja, allyyliyhdisteitä ja nitroyhdisteitä (3). On todettu myös, että tiettyjä mutageeniryhmiä ei pystytä aina toteamaan standardeilla menetelmillä, kuten maljainkorporoitumis- tai preinkubaatiomenetelmällä. Näitä on pidettävä erikoistapauksina, ja niiden toteamiseen tulisi ehdottomasti käyttää vaihtoehtoisia menetelmiä. Seuraavat erikoistapaukset on voitu tunnistaa (sekä esimerkkejä toimenpiteistä, joita voidaan käyttää niiden toteamisessa): atsovärit ja diatsoyhdisteet (3) (5) (6) (13), kaasut ja haihtuvat kemialliset aineet (12) (14) (15) (16) ja glykosidit (17) (18). Poikkeaminen standardista menetelmästä on perusteltava tieteellisesti.

1.5 TESTIN KUVAUS

1.5.1 **Testin valmistelu**

1.5.1.1 *Bakteerit*

Tuoreita bakteeriviljelmiä on kasvatettava myöhäiseen eksponentiaaliseen tai varhaiseen stationääriseen kasvuaiheeseen (noin 10^9 solua/-ml). Myöhäisessä stationäärivaiheessa olevia viljelmiä ei pidä käyttää. Oleellista on, että kokeessa käytettävät viljelmät sisältävät elinkykyisiä soluja suurina tittereinä. Titteri voidaan osoittaa joko aikaisemmissa kontrollitutkimuksissa saatujen kasvukäyrien perusteella tai määrittämällä jokaisessa analyysissä elinkykyisten solujen lukumäärät maljakokeella.

Suositeltu inkubaatiolämpötila on 37 °C.

On käytettävä vähintään viittä bakteerikantaa. Näihin tulee sisältyä neljä *S. typhimurium* -kantaa (TA 1535; TA 1537 tai TA97a tai TA97; TA98; ja TA100), joiden on osoitettu olevan luotettavia ja joilla on saatu toistettavissa oleva vaste eri laboratorioissa. Näissä neljässä *S. typhimurium* -kannassa on GC-emäsparit primaarisessa takaisinmutaatiokohdassa, ja tiedetään, että ne eivät ehkä paljasta tiettyjä hapettavia mutageeneja, ristisidoksia muodostavia aineita eivätkä hydratsiineja. Tällaiset aineet voidaan todeta *E. coli* WP2 -kannoilla tai *S. typhimurium* TA 102 -kannalla (19), joissa on AT-emäspari primaarisessa takaisinmutaatiokohdassa. Suositeltava kantojen yhdistelmä on tämän vuoksi:

— *S. typhimurium* TA 1535, ja

— *S. typhimurium* TA 1537 tai TA97 tai TA97a, ja

— *S. typhimurium* TA98, ja

— S. *typhimurium* TA100, ja

— *E. coli* WP2 uvrA tai *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) tai *S. typhimurium* TA102.

Ristisidoksia muodostavien mutageenien toteamiseksi mukaan tulisi ehkä käyttää TA102-kantaa tai käyttää lisäksi DNA:n korjautumiseen kykenevää *E. coli* -kantaa (esim. *E. coli* WP2 tai *E. coli* WP2 (pKM101)).

▼B

Varastoviljelmien valmistuksessa, markkerien vahvistamisessa ja säilytyksessä on käytettävä vakiintuneita menetelmiä. Kasvuun vaadittavien aminohappojen tarve on osoitettava kunkin jäädytetyn varastoviljelmäpreparaatin osalta erikseen *(S. typhimurium* -kannoilla histidiini ja *E. coli* -kannoilla tryptofaani). Muut fenotyyppiset ominaisuudet on tarkistettava vastaavasti. Niitä ovat: R-tekijäplasmidien esiintyminen tai puuttuminen, mikäli sillä on merkitystä (ampisilliiniresistenssi kannoissa TA98, TA100 ja TA97a tai TA97, WP2 uvrA ja WP2 uvrA (pKM101) ja ampisilliini- ja tetrasykliiniresistenssi kannassa TA102); tyypillisten mutaatioiden esiintyminen (kristalliviolettiherkkyyden aiheuttama rfa-mutaatio *S. typhimurium* -bakteerissa ja ultraviolettivaloherkkyyden aiheuttama uvrA-mutaatio *E. coli* -bakteerissa tai uvrB-mutaatio *S. typhimurium* -bakteerissa) (2) (3). Kantojen tuottamien spontaanien revertanttien pesäkkeiden määrän tulisi myös olla laboratoriokohtaisten vertailuarvojen esiintymistiheysalueella ja mieluiten kirjallisuudessa raportoidulla alueella.

1.5.1.2 *Kasvatusväliaine*

Käytetään sopivaa minimaalista agaria (sisältää esim. Vogel-Bonner minimal medium E:tä ja glukoosia) ja ”overlay”-agaria. joka sisältää histidiiniä ja biotiinia tai tryptofaania, jotta muutama solunjakautuminen voi tapahtua (1) (2) (9).

1.5.1.3 *Metabolinen aktivaatio*

Bakteerit on altistettava tutkittavalle aineelle sekä sopivan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:11ä (1) (2) tai fenobarbitonin ja ß-naftoflavonin (18) (20) (21) yhdistelmällä, käsiteltyjen jyrsijöiden maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Käytetty postmitokondriaalisen jakeen pitoisuus S9-seoksessa on yleensä 5–30 % v/v. Metabolisen aktivaatiojärjestelmän valinta tai sen pois jättäminen saattaa riippua siitä, millaiseen kemiallisten aineiden ryhmään tutkittava aine kuuluu. joissakin tapauksissa saattaa olla perusteltua käyttää useampia kuin yhtä postmitokondriaalisen jakeen pitoisuutta. Pelkistävä metabolinen aktivaatiojärjestelmä saattaa soveltua paremmin atsovärien ja diatsoyhdisteiden tutkimiseen (6) (13).

1.5.1.4 *Tutkittava aine/valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen bakteerien altistamista. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan lisätä suoraan koejärjestelmään ja/tai laimentaa ennen käsittelyä. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

Liuotin/kantaja-aine ei saa olla sellainen, että sen voidaan epäillä reagoivan kemiallisesti tutkittavan aineen kanssa, eikä se saa vaikutta solujen elinkykyyn eikä S9-aktiivisuuteen (22). Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden yhteensopivuuden osoittavat tutkimustulokset on esitettävä. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä tulisi harkita ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Testattaessa aineita, jotka ovat epästabiileja vedessä, orgaanisten liuottimien tulisi olla vedettömiä.

▼B

1.5.2 **Koeolosuhteet**

1.5.2.1 *Testikannat (ks. 1.5.1.1)*

1.5.2.2 *Altistuspitoisuus*

Tutkittavan aineen suurinta testattavaa pitoisuutta määritettäessä on otettava huomioon aineen sytotoksisuus ja liukoisuus altistuksessa käytettävään lopulliseen seokseen.

Myrkkyvaikutus ja liukenemattomuus saattaa olla hyödyllistä määrittää alustavalla kokeella. Sytotoksisuus voidaan havaita revertanttien pesäkkeiden lukumäärän pienenemisestä, taustakasvuston kirkastumisesta tai vähenemisestä tai solujen eloonjäämisasteesta käsitellyissä viljelmissä. Aineen sytotoksisuus saattaa muuttua metabolisten aktivaatiojärjestelmien läsnäollessa. Liukenemattomuus on arvioitava lopullisen seoksen paljaalla silmällä havaittavan sakkautumisen perusteella todellisissa koeolosuhteissa.

Liukoisten, ei-sytotoksisten aineiden suositeltu testattava maksimipitoisuus on 5 mg/malja tai 5 ul/malia. Testattaessa ei-sytotoksisia aineita, jotka eivät ole liukoisia pitoisuuksissa 5 mg/malja tai 5 µl/malja. yhden tai useamman testattavan pitoisuuden on oltava liukenemattomia lopullisessa altistusseoksessa. Jos tutkittava aine on sytotoksinen jo pienempinä pitoisuuksina kuin 5 mg/malja tai 5 µl/malja, se olisi testattava sytotoksiseen pitoisuuteen asti. Sakka ei saisi vaikuttaa laskentaan.

Alustavassa kokeessa on käytettävä ainakin viittä erisuuruista tutkittavan aineen analysoitavissa olevaa pitoisuutta siten, että testauspisteiden välillä on noin puolen log:n (√10) väli. Pitoisuus-vastesuhdetta tutkittaessa voi olla syytä käyttää pienempiä välejä. Arvioitaessa aineita, jotka sisältävät huomattavia määriä mahdollisia mutageenisia epäpuhtauksia, voidaan harkita testaamista myös suuremmilla pitoisuuksilla kuin 5 mg/malja tai 5 µl/malja.

1.5.2.3 *Negatiiviset ja positiiviset kontrollit*

Jokaisessa testissä on käytettävä myös kannan suhteen spesifisiä rinnakkaisia positiivisia ja negatiivisia (liuotin tai kantaja-aine) kontrolleja sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Positiivisen kontrolliaineen pitoisuudet on valittava siten, että ne tuovat esiin kunkin testin tehokkuuden.

Testeissä, joissa käytetään metabolista aktivaatiojärjestelmää, positiivinen (positiiviset) kontrolliaine(et) on valittava käytettävien bakteerikantojen tyypin perusteella.

Seuraavassa on esimerkkejä sopivista positiivisista kontrolliaineista testeissä, joissa käytetään metabolista aktivaatiota:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
9,10-dimetyyliantraseeni	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetyylibents[a]antraseeni	57-97-6	200-359-5
bentso[a]pyreeni	50-32-8	200-028-5
2-aminoantraseeni	613-13-8	210-330-9

▼B

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
syklofosfamidi	50-18-0	
syklofosfamidimonohydraatti	6055-19-2	200-015-4

Seuraava aine sopii positiiviseksi kontrollialueeksi pelkistävää metabolista aktivaatiota käytettäessä:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
Congo Red	573-58-0	209-358-4

2-aminoantraseenia ei pidä käyttää ainoana S9-seoksen tehon indikaattorina. Jos 2-aminoantraseenia käytetään, jokainen S9-erä on karakterisoitava myös mutageenilla, joka vaatii mikrosomaalisiin entsyymeihin perustuvaa metabolista aktivaatiota, esim. bentso[a]pyreenilla, dimetyylibentsantraseenilla.

Seuraavat aineet ovat esimerkkejä kannan suhteen spesifisistä positiivisista kontrolleista, joita voidaan käyttää ilman eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää tehtävissä testeissä:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro	Kanta
natriumatsidi	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 ja TA 100
2-nitrofluoreeni	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoakridiini	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
kumeenihydroperoksidi	80-15-9	201-254-7	TA 102
mitomysiini C	50-07-7	200-008-6	WP2uvrA ja TA 102
N-etyyli-N-nitro-N-nitrosoguanidiini	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA(pKM101)
4-nitrokinoliini-l-oksidi	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA(pKM101)
furyylifuramidi (AF2)	3688-53-7		plasmidin sisältävät kannat

Myös muita soveltuvia positiivisia kontrolleja voidaan käyttää. Samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvien positiivisten kontrollien käyttöä on harkittava, mikäli niitä on käytettävissä.

Lisäksi on käytettävä pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta negatiivisina kontrolleina, jotka eivät sisällä tutkittavaa ainetta mutta joita muutoin käsitellään samalla tavoin. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos kontrolleista saadut aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, ettei valittu liuotin aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

▼B

1.5.3 **Testin suorittaminen**

Maljainkorporoitumismenetelmässä (1) (2) (3) (4), jossa ei käytetä metabolista aktivaatiota, 0,05 ml tai 0,1 ml tutkittavia liuoksia, 0,1 ml tuoretta bakteeriviljelmää (noin 10^8 elinkykyistä solua) ja 0,5 ml steriiliä puskuria sekoitetaan 2 ml:aan ”overlay”-agaria. Metabolista aktivaatiojärjestelmää käytettäessä 0,5 ml metabolista aktivaatioseosta. jossa on riittävä määrä postmitokondriaalista jaetta (pitoisuus 5–30 % v/v metabolisessa aktivaatioseoksessa), sekoitetaan ”overlay”-agariin (2,0 ml) yhdessä bakteerien ja tutkittavan aineen/-tutkittavan liuoksen kanssa. Jokaisen koeputken sisältö sekoitetaan ja kaadetaan minimaalisen agarmaljan pinnalle. ”Overlay”-agarin annetaan jähmettyä ennen inkubaatiota.

Preinkubaatiomenetelmässä (2) (3) (5) (6) tutkittavaa ainetta/-tutkittavaa liuosta esi-inkuboidaan testikannan (noin 10^8 elinkykyistä solua) ja steriilin puskurin tai metabolisen aktivaatiojärjestelmän (0,5 ml) kanssa yleensä vähintään 20 minuuttia 30–37 °C:ssa, ennen kuin se sekoitetaan ”overlay”-agariin ja kaadetaan minimaalisen agarmaljan pinnalle. Yleensä 0,05 tai 0,1 ml tutkittavaa ainetta/tutkittavaa liuosta, 0,1 ml bakteereja ja 0,5 ml S9-seosta tai steriiliä puskuria sekoitetaan 2,0 ml:aan ”overlay”-agaria. Koeputket tulisi ilmata preinkubaation aikana sekoittajaa käyttäen.

Riittävän arvion tekemiseksi hajonnasta on käytettävä kolmea rinnakkaista maljaa kullakin annostasolla. Kaksoismaljauksen käyttö on mahdollista, mikäli se voidaan perustella tieteellisesti. Satunnainen maljan menetys ei välttämättä mitätöi analyysiä.

Kaasumaisia tai haihtuvia aineita tulisi testata asianmukaisin menetelmin, esimerkiksi suljetuissa astioissa (12) (14) (15) (16).

1.5.4 **Inkubaatio**

Kaikkia tiettyyn testiin kuuluvia maljoja on inkuboitava 37 °C:ssa 48–72 tunnin ajan. Inkubaatioajan jälkeen lasketaan revertanttien pesäkkeiden lukumäärä maljaa kohti.

2. **TULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tulokset on ilmoitettava revertanttien pesäkkeiden lukumääränä maljaa kohti. Revertanttien pesäkkeiden määrä sekä negatiivisissa (liuotinainekontrolli ja käsittelemätön kontrolli, jos käytetty) että positiivisissa kontrollimaljoissa on myös ilmoitettava. Maljakohtaiset lukumäärät, revertanttien pesäkkeiden maljakohtaisten määrien keskiarvo ja keskihajonta on ilmoitettava tutkittavan aineen ja positiivisten ja negatiivisten (käsittelemättömät ja/tai liuotinaine) kontrollien osalta.

Selvää positiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa. Epäselvät tulokset on selvitettävä jatkotestauksella mieluiten muunnelluissa koeolosuhteissa. Negatiiviset tulokset on vahvistettava tapauskohtaisesti. Ellei negatiivisten tulosten vahvistamista jossakin tapauksessa pidetä tarpeellisena, tämä päätös on perusteltava. Tutkimusparametrien muuttamista koeolosuhteiden monipuolistamiseksi on harkittava seurantatutkimuksia tehtäessä. Mahdollisia muutettavia tutkimusparametreja ovat pitoisuusvälit, altistusmenetelmä (maljainkorporoitumiskoe tai nesteen preinkubointi) ja metaboliset aktivaatiojärjestelmät.

▼B

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten pitoisuudesta riippuva revertanttien pesäkkeiden maljakohtaisen lukumäärän suureneminen koko testatulla annosalueella ja/tai toistettavissa oleva lisääntyminen yhdellä tai useammalla pitoisuustasolla vähintään yhdessä kannassa joko metabolista aktivaatiojärjestelmää käytettäessä tai ilman sitä (23). Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (24). Tilastollinen merkitsevyys ei saa kuitenkaan olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Bakteereilla tehtävässä takaisinmutaatiotestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa pistemutaatioita emässubstituutioiden tai lukukehyksensiirtojen kautta joko *Salmonella typhimurium*- ja/tai *Escherichia coli* -bakteerien genomissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei testattava aine ole koeolosuhteissa mutageeninen testatulla lajilla.

3. **RAPORTOINTI**

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Kannat:

— käytetyt kannat,

— solujen määrä viljelmää kohti,

— kannan ominaisuudet.

Koeolosuhteet:

— tutkittavan aineen määrä maljaa kohti (mg/malja tai µl/malja) sekä annoksen valinnan ja kutakin pitoisuutta kohti valittujen maljojen lukumäärän perustelut,

— käytetty kasvatusväliaine,

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus sekä hyväksymiskriteerit,

— altistusmenettely.

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— sakkautumisen merkit,

— maljakohtaiset määrät,

▼B

— revertanttien pesäkkeiden määrä maljaa kohti ja keskihajonta,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— rinnakkaisista negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tulokset, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat,

— aikaisemmat negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tutkimustulokset, myös vaihteluväli, keskiarvot ja keskihajonnat,

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUTTA**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 31, s. 347–364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 113, s. 173–215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.,* 312, s. 217–233.

(4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella* typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency GeneTox Program, *Mutation Res.,* 168, s. 69–240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters* 1, s. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Delecting Carcinogens,* ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, s. 273–285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland. I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests*: *UKEMS Part I Revised,* ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, s. 13–61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb. U. and Porchet, E. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety,* 8, s. 167–77.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutation Res.,* 38, s. 33–42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L, Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures,* 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, s. 141–161.

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis With Strains of *Salmonella typhimurium, Environmental Mutagenesis,* 3, s. 45–465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.,* 307, s. 335–344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidinc-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.,* 136, s. 33–47.

(14) Zeiger, E., Anderson. B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.,* 19, s. 2–141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology,* D. Scott, B. Bridges and F., Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, s. 249–258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis,* 9, s. 421–441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium, Cancer Res.,* 39, s. 3780–3782.

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 77, s. 4961–4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of .*Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis,* 5, s. 285–291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, e*ds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, s. 85–88.

(21) Elliot. B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternativcs to Aroclor 1254-induccd 89 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis, 7,* s. 175–177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/ Microsome Test, *Mutation Res.,* 88, s. 343–350.

(23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.,* 189, s. 83–91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L, Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, s. 28–65.

▼B

B.15. **MUTAGEENISUUSTESTAUS JA KARSINOGEENISTEN AINEIDEN SEULONTA GEENIMUTAATIOT — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Saccharomyces cerevisiae -hiivalla on joukko haploidisia ja diploidisia kantoja, joiden avulla voidaan mitata kemiallisten aineitten kykyä aiheuttaa geenimutaatioita ilman metabolista aktivaatiota tai metabolisen aktivaation jälkeen.

Testeissä on käytetty haploidisten kantojen mutaatioita, esim. punaisen, adeniinia vaativan kannan *(ade-1 ade-2)* mutaatiota kaksinkertaisen määrän adeniinia vaativaksi valkoiseksi kannaksi, ja selektiivisiä koejärjestelyitä, kuten kanavnaiini- ja sykloheksimidiresistenssin induktiota.

Laajimmin tutkitussa takaisinmutaatiojärjestelmässä käytetään haploidista XV 185-14C -kantaa, jolla on ”ochre”-nonsense- mutaatiot *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 ja *trp* 5-48, joiden takaisinmutaatiota saavat aikaan sellaiset emäsvaihdoksia aiheuttavat mutageenit, jotka aiheuttavat paikkaspesifisiä mutaatioita tai ”ochre”-suppressorimutaatioita. XV 185-14C -kannalla on myös *his* 1-7 -markkeri, missensemutaatio, jonka takaisinmutaatiota saavat aikaan lähinnä muissa kohdissa tapahtuvat mutaatiot, ja *hom* 3-10 -markkeri, jonka takaisinmutaatiota saavat aikaan lukuraamiinsiirtomutageenit.

Diploidisista *S. cerevisiae* -kannoista ainoa laajassa käytössä oleva on D_7, joka on homotsygoottinen geenin *ilv* 1-92 suhteen.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

Tutkittavat aineet ja kontrolliaineet tulee sekoittaa soveltuvaan kantaja-aineeseen juuri ennen testiä. Veteen liukenemattomia orgaanisia yhdisteitä tutkittaessa saa orgaanisen liuottimen, kuten etanolin, asetonin tai dimetyylisulfoksidin (UMSO) loppupitoisuus olla korkeintaan 2 tilavuus- %. Kantaja-aineen loppupitoisuus ei saa merkitsevästi vaikuttaa solujen elinkykyyn ja kasvuominaisuuksiin.

▼B

Metabolinen aktivaatio

Solut on altistettava tutkittaville aineille sekä ilman eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää että soveltuvan eksogeenisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa.

Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla käsiteltyjen jyrsijöiden maksoista eristetty postmitokondriaalinen jae, johon on lisätty kofaktoreita. Myös muista lajeista, muista kudoksista tai muista postmitokondriaalisista jakeista peräisin olevat valmisteet tai muut menetelmät saattavat soveltua metaboliseen aktivaatioon.

Koeolosuhteet

Testikannat

Geenimutaatiotutkimuksissa yleisimmin käytetyt kannat ovat haploidinen XV 185-14C -kanta ja diploidinen D_7-kanta. Myös muut kannat saattavat soveltua tarkoitukseen.

Kasvatusalustat

Hiivojen kuolleisuuden määrittämiseen ja mutanttien määrien laskemiseen käytetään soveltuvia kasvatusalustoja.

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Testissä on käytettävä rinnakkaisia altistamattomia, testattavan aineen liuottimelle altistettuja ja positiivisia kontrolliviljelmiä. Kunkin tutkittavan mutaation kohdalla on käytettävä soveltuvia positiivisia kontrolliaineita.

Altistuspitoisuudet

Tutkittava aine on testattava vähintään viitenä eri pitoisuutena, joiden keskinäiset erot ovat sopivat. Myrkyllisillä aineilla korkein testattu pitoisuus ei saa aiheuttaa yli 5-10 %.m kuolleisuutta. Huonosti veteen liukenevilla aineilla liukoisuus määrää korkeimman tutkittavan pitoisuuden. Vesiliukoisten myrkyttömien aineiden korkein tutkittava pitoisuus on päätettävä tapauskohtaisesti.

Inkubaatio-olosuhteet

Maljoja inkuboidaan pimeässä 28–30 °C:n lämpötilassa 4–7 vrk:n ajan.

Spontaanimutaatioiden frekvenssi

Testissä on käytettävä jatkoviljelmiä, joiden spontaanimutaatioiden frekvenssi on normaalina pidettävällä tasolla.

▼B

Toistojen lukumäärä

Kussakin pitoisuudessa maljat tehdään ainakin kolmena kappaleena geenimutaation tuottamien prototrofien määrän laskemista ja solujen kuolleisuuden määrittämistä varten. Kokeissa, joissa käytetään alhaisen mutaatiofrekvenssin omaavia markkereita, kuten *hom* 3–10, rinnakkaisten maljojen määrää on lisättävä tilastollisesti käyttökelpoisten tulosten saamiseksi.

Testin suorittaminen

S. cerevisiae -solujen altistus suoritetaan tavallisesti nesteessä stationäärivaiheessa olevilla tai kasvavilla soluilla. Ensimmäinen koe on tehtävä kasvavilla soluilla, siten että 1-5 x 10^7 solua/ml altistetaan tutkittavalle aineelle ja seosta ravistellaan 18 tunnin ajan 28–37 °C:ssa; altistuksen aikana seokseen lisätään sopiva määrä metabolista aktivaatioseosta, tarpeen mukaan. Altistuksen jälkeen solut sentrifugoidaan, huuhdotaan ja kylvetään sopivalle kasvatusalustalle. Inkubaation jälkeen maljoilta lasketaan solujen kuolleisuus ja tapahtuneet geenimutaatiot. Jos ensimmäisen kokeen tulos on negatiivinen, tehdään toinen koe stationäärivaiheessa olevilla soluilla. Jos ensimmäisen kokeen tulos on positiivinen, tulos varmistetaan soveltuvalla erillisellä kokeella.

2. TULOKSET

Tulokset on esitettävä taulukkoina siten, että niistä käyvät ilmi pesäkkeiden lukumäärä, mutanttien lukumäärä, kuolleisuus ja mutaatiofrekvenssi. Kaikki tulokset on varmistettava erillisellä kokeella. Tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin.

3. RAPORTOINTI

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— käytetty kanta,

— koeolosuhteet: stationäärivaiheessa olevien tai kasvavien solujen käyttö, kasvatusalustojen koostumus, inkubaatiolämpötila ja inkubaatioaika, metabolinen aktivaatiojärjestelmä,

— altistusolosuhteet: altistuspitoisuudet, altistusmenetelmä ja altistuksen kesto, altistuslämpötila, positiiviset ja negatiiviset kontrollit,

— pesäkkeiden lukumäärä, mutanttien lukumäärä, kuolleisuus, mutaatiofrekvenssi, annos/vastesuhde mikäli mahdollista, tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼B

B.16. **MITOOTTINEN REKOMBINAATIO — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Saccharomyces cerevisiae -hiivalla esiintyy mitoottista rekombinaatiota sekä geenien välillä (tai yleisemmin ottaen geenin ja sentromeerin välillä) että geenien sisällä. Ensin mainittu ilmiö on nimeltään mitoottinen tekijäinvaihto ja siinä kaksi sisarkromatidia vaihtaa keskenään osia. Jälkimmäinen ilmiö on yleensä yksisuuntainen ja nimeltään geenikonversio. Tekijäinvaihtotutkimukset perustuvat yleensä heterotsygoottiseen kantaan ilmaantuvien resessiivisten homotsygoottisten pesäkkeiden tai maljasektoreiden laskentaan, kun taas geenikonversioiden tutkiminen perustuu prototrofisten revertanttien laskentaan auksotrofisilla heteroalleelisilla kannoilla, joilla on kaksi erilaista viallista alleelia samasta geenistä. Yleisimmin mitoottisen geenikonversion tutkimiseen käytettyjä kantoja ovat D_4 (heteroalleelinen *ade* 2 ja *trp* 5 -lokusten suhteen), D_7 (heteroalleelinen *trp* 5 -lokuksen suhteen), BZ_{34} (heteroalleelinen *arg* 4 -lokuksen suhteen) ja JD1 (heteroalleelinen *his* 4 ja *trp* 5 -lokusten suhteen). Mitoottista tekijäinvaihtoa voidaan testata kannoilla D_5 ja D_7 (jälkimmäisellä voidaan havainnoida myös mitoottista geenikonversiota ja takaisinmutaatiota il*v* 1-92 -lokuksessa), jotka kummatkin ovat heteroalleelisia *ade 2* -lokuksen komplementtigeenien suhteen ja joissa mitoottinen tekijäinvaihdos ilmenee maljoilla punaisina tai vaaleanpunaisina homotsygoottisina sektoreina.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

Tutkittavat aineet sekä kontrolli- tai vertailuyhdisteet on sekoitettava soveltuvaan kantaja-aineeseen juuri ennen testiä. Veteen liukenemattomia orgaanisia yhdisteitä tutkittaessa saa orgaanisen liuottimen, kuten etanolin, asetonin tai dimetyylisulfoksidin (DMSO) loppupitoisuus olla korkeintaan 2 tilavuus- %. Kantaja-aineen loppupitoisuus ei saa merkitsevästi vaikuttaa solujen elinkykyyn ja kasvuominaisuuksiin.

Metabolinen aktivaatio

Solut on altistettava tutkittaville aineille sekä ilman eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää että soveltuvan eksogeenisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla käsiteltyjen jyrsijöiden maksoista eristetty postmitokondriaalinen jae, johon on lisätty kofaktoreita. Myös muista lajeista, muista kudoksista tai muista postmitokondriallisista jakeista peräisin olevat valmisteet tai muut menetelmät saattavat soveltua metaboliseen aktivaatioon.

▼B

Koeolosuhteet

Testikannat

Yleisimmin käytettyjä ovat diploidiset kannat D_4, D_5, D_7 ja JD1. Myös muut kannat saattavat soveltua tarkoitukseen.

Kasvatusalustat

Hiivojen kuolleisuuden ja mitoottisen rekombinaatiofrekvenssin määrittämiseen käytetään soveltuvia kasvatusalustoja.

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Testissä on käytettävä rinnakkaisia altistamattomia, testattavan aineen liuottimelle altistettuja ja positiivisia kontrolliviljelmiä. Kunkin tutkittavan rekombinaation kohdalla on käytettävä soveltuvia positiivisia kontrolliaineita.

Altistuspitoisuudet

Tutkittava aine on testattava vähintään viitenä eri pitoisuutena, joiden keskinäiset erot ovat sopivat. Huomioon otettavia seikkoja ovat mm. aineen sytomyrkyllisyys ja liukoisuus. Alin pitoisuus ei saa lainkaan lisätä solujen kuolleisuutta. Myrkyllisillä aineilla korkein testattu pitoisuus ei saa aiheuttaa yli 5–10 %:n kuolleisuutta. Huonosti veteen liukenevilla aineilla liukoisuus määrää korkeimman tutkittavan pitoisuuden. Vesiliukoisten myrkyttömien aineiden korkein tutkittava pitoisuus on päätettävä tapauskohtaisesti.

Solut voidaan altistaa tutkittavalle aineelle joko stationäärivaiheessa tai kasvuvaiheessa, ja pisin altistusaika voi olla 18 tuntia. Pitkässä altistuksessa viljelmiä on kuitenkin seurattava mikroskoopilla mahdollisen itiönmuodostuksen varalta, sillä itiönmuodostus pilaa testin.

Inkubaatio-olosuhteet

Maljoja inkuboidaan pimeässä 28–30 °C:n lämpötilassa 4–7 vrk:n ajan. Maljoja, joilta tutkitaan mitoottisen tekijäinvaihdoksen aikaansaamat punaiset ja vaaleanpunaiset homotsygoottiset sektorit, on inkuboinnin jälkeen säilytettävä jääkaapissa (noin 4 °C:ssa) yhdestä kahteen vuorokautta ennen laskemista, jotta pesäkkeiden väri ehtii kehittyä.

Spontaaninen mitoottinen rekombinaatiofrekvenssi

Testissä on käytettävä jatkoviljelmiä, joiden spontaaninen mitoottinen rekombinaatiofrekvenssi on normaalina pidettävällä tasolla.

▼B

Toistojen lukumäärä

Kussakin pitoisuudessa maljat tehdään ainakin kolmena kappaleena mitoottisen geenikonversion tuottamien prototrofien määrän laskemista ja solujen kuolleisuuden määrittämistä varten. Kokeissa, joissa lasketaan mitoottisen tekijäinvaihdon aikaansaamia resessiivisiä homotsygootteja, rinnakkaisten maljojen määrää on lisättävä riittävän pesäkemäärän saamiseksi.

Testin suorittaminen

S. cerevisiae -solujen altistus suoritetaan tavallisesti nesteessä stationäärivaiheessa olevilla tai kasvavilla soluilla. Ensimmäinen koe on tehtävä kasvavilla soluilla, siten että 1-5 x 10^7 solua/ml altistetaan tutkittavalle aineelle ja seosta ravistellaan 18 tunnin ajan 28–37 °C:ssa; altistuksen aikana seokseen lisätään sopiva määrä metabolista aktivaatioseosta, mikäli tarpeellista.

Altistuksen jälkeen solut sentrifugoidaan, huuhdotaan ja kylvetään sopivalle kasvatusalustalle. Inkubaation jälkeen maljoilta lasketaan solujen kuolleisuus ja tapahtuneet mitoottiset rekombinaatiot.

Jos ensimmäisen kokeen tulos on negatiivinen, tehdään toinen koe stationäärivaiheessa olevilla soluilla. Jos ensimmäisen kokeen tulos on positiivinen, tulos varmistetaan erillisellä kokeella.

2. **TULOKSET**

Tulokset on esitettävä taulukkoina siten, että niistä käyvät ilmi pesäkkeiden lukumäärä, rekombinanttien lukumäärä, kuolleisuus ja rekombinaatiofrekvenssi.

Tulokset on varmistettava erillisellä kokeella.

Tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— käytetty kanta,

— koeolosuhteet: stationäärivaiheessa olevien tai kasvavien solujen käyttö, kasvatusalustojen koostumus, inkubaatiolämpötila ja inkubaatioaika, aineenvaihdunnallinen aktivaatiojärjestelmä,

— altistusolosuhteet: altistuspitoisuudet, altistusmenetelmä ja altistuksen kesto, altistuslämpötila, positiiviset ja negatiiviset kontrollit,

— pesäkkeiden lukumäärä, rekombinanttien lukumäärä, kuolleisuus, rekombinaatiofrekvenssi, annos/vastesuhde mikäli mahdollista, tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta,

▼B

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼B

B.17. **MUTAGEENISUUS — GEENIMUTAATIOTESTI NISÄKÄSSOLUILLA *IN VITRO***

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 476, *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkässoluviljelmissä tehtävää *in vitro* -geenimutaatiotestiä voidaan käyttää kemiallisten aineiden aiheuttamien geenimutaatioiden toteamiseen. Sopivia solulinjoja ovat hiiren lymfoomasolulinja L5178Y, kiinanhamsterin solulinjat CHO, CHO-AS52 ja V79 ja ihmisen lymfoblastoidisolulinja TK6 (1). Näissä solulinjoissa yleisimmin käytetyt geneettiset tulostapahtumat mittaavat tymidiinikinaasi- (TK) ja hypoksantiini-guaniinifosforibosyyli-transferaasilokusten (HPRT) mutaatioita ja ksantiiniguaniinifosforibosyylitransferaasin (XPRT) transgeeniä. TK-, HPRT- ja XPRT-mutaatiotesteillä voidaan havaita erilaisia geneettisiä tapahtumia. Koska TK ja XPRT sijaitsevat autosomissa, niiden avulla voidaan ehkä havaita sellaisia geneettisiä tapahtumia (esim. suuria deleetioita), joita ei voida havaita X-kromosomicn HPRT-lokuksessa (2) (3) (4) (5) (6).

Nisäkässoluilla tehtävissä *in vitro* -geenimutaatiotesteissä voidaan käyttää pysyvien solulinjojen tai solukantojen viljelmiä. Solujen valintakriteereinä käytetään niiden kykyä kasvaa viljelmässä ja niiden spontaanimutaatiotaajuuden stabiliteettia.

In vitro tehtävät testit vaativat yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiota. Tällainen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei pysty täysin jäljittelemään *in vivo* -olosuhteita nisäkkäissä. On pyrittävä välttämään erityisesti sellaisia olosuhteita, joissa saatavat positiiviset tulokset eivät heijasta aineen luontaista mutageenisuutta ja saattavat johtua pH:n muutoksista, osmolaliteetista tai voimakkaasta sytotoksisuudesta (7).

Tätä testiä käytetään nisäkkäiden mahdollisten mutageenien ja karsinogeenien seulontaan. Monet yhdisteet, joilla saadaan positiivinen tulos tässä testissä, ovat nisäkkäiden karsinogeeneja. Tämän testin ja karsinogeenisuuden välillä ei kuitenkaan ole täydellistä korrelaatiota. Korrelaatio riippuu aineryhmän kemiallisista ominaisuuksista, ja yhä useammat tutkimustulokset viittaavat siihen, että on olemassa karsinogeeneja, joita ei voida havaita tällä testillä, koska ne näyttävät vaikuttavan muiden, ei-genotoksisten mekanismien tai bakteerisoluista puuttuvien mekanismien välityksellä (6).

Ks. myös Yleinen johdanto Osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Forward-mutaatio: geenin mutaatio parentaalisesta tyypistä mutanttimuotoon, minkä seurauksena geenin koodittama valkuaisaine menettää entsymaattisen aktiivisuutensa tai sen entsyymiaktiivisuus muuttuu.

Emäsparien korvautumista aiheuttavat mutageenit: aineita, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin substituution DNA:ssa.

Lukukehyksensiirtomutageenit: aineita, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin ylimäärän tai vajauksen DNA-molekyylissä.

▼B

Fenotyypin ilmentymisaika: ajanjakso, jonka aikana muuttumattomat geenituotteet poistuvat hiljattain mutatoituneista soluista.

Mutaatiotaajuus: todettu mutanttien solujen lukumäärä jaettuna elinkykyisten solujen määrällä.

Suhteellinen kokonaiskasvu: solumäärän suureneminen tietyssä ajassa verrattuna kontrollina käytettävään solupopulaatioon; lasketaan tulona, joka saadaan kertomalla keskenään suspensiokasvu suhteessa negatiiviseen kontrolliin ja kloonaustehokkuus suhteessa negatiiviseen kontrolliin.

Suhteellinen suspensiokasvu: solujen lukumäärän suureneminen ilmentymisajan kuluessa verrattuna negatiiviseen kontrolliin.

Elinkykyisyys: tutkittavalle aineelle altistettujen solujen kloonaustehokkuus maljausajankohtana selektiivisissä olosuhteissa ilmentymisajan jälkeen.

Eloonjääneisyys: tutkittavalle aineelle altistettujen solujen kloonaustehokkuus maljattaessa altistusjakson lopussa; eloonjääneisyys ilmoitetaan yleensä suhteessa kontrollina käytetyn solupopulaation eloonjääneisyyteen.

1.3 TESTIN PERIAATE

Solut, joista $TK^{+/-}$ → TK-/- -mutaation seurauksena puuttuu tymidiinikinaasi (TK), ovat resistenttejä pyrimidiinianalogitrifluorotymidiinin (TFT) sytotoksisille vaikutuksille. Tymidiinikinaasin läsnä ollessa solut ovat herkkiä TFT:lle, joka estää solun aineenvaihduntaa ja pysäyttää solunjakautumisen. Mutantit solut kykenevät siis lisääntymään TFT:n läsnä ollessa, kun taas normaalit, tymidiinikinaasia sisältävät, solut eivät kykene. Vastaavasti solut, joista puuttuu HPRT- tai XPRT-entsyymi, ovat resistenttejä 6-tioguaniinille (TG) tai 8-atsaguaniinille (AG). Tutkittavan aineen ominaisuuksiin on kiinnitettävä erityistä huomiota, jos selektiivisen aineen emäsanalogia tai sille kemiallisesti sukua olevaa ainetta testataan millä tahansa nisäkässoluissa tehtävällä geenimutaatiotestillä. Esimerkiksi tutkittavan aineen mahdollinen epäilty selektiivinen myrkkyvaikutus mutantteihin ja ei-mutantteihin soluihin on selvitettävä. Selektiivisen järjestelmän/aineen toimintakyky on sen vuoksi vahvistettava testattaessa kemiallisia aineita, jotka ovat rakenteeltaan selektiivisen aineen kaltaisia (8).

Suspensiossa tai yksikerrosviljelmässä olevat solut altistetaan sopivaksi ajaksi testattavalle aineelle sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä ja jatkoviljellään sytotoksisuuden toteamiseksi ja fenotyypin ilmentymisen aikaansaamiseksi ennen mutanttien selektiota (9) (10) (11) (12) (13). Sytotoksisuus määritetään yleensä mittaamalla viljelmien suhteellinen kloonaustehokkuus (eloonjääneisyys) tai suhteellinen kokonaiskasvu altistusjakson jälkeen. Altistettuja viljelmiä pidetään kasvatusväliaineessa riittävän pitkä aika, joka on jokaiselle valitulle lokukselle ja solutyypille ominainen, jotta aikaansaatujen mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista. Mutaatiotaajuus lasketaan siten, että tunnettu lukumäärä soluja kylvetään toisaalta mutanttien toteamiseksi selektiivistä ainetta sisältävälle alustalle, toisaalta kloonaustehokkuuden (elinkykyisyyden) määrittämiseksi alustalle, joka ei sisällä selektiivistä ainetta. Sopivan inkubaatioajan kuluttua lasketaan pesäkkeet. Mutaatiotaajuus lasketaan selektiivisellä alustalla todettujen mutanttipesäkkeiden lukumäärän ja ei-selektiivisellä alustalla todettujen pesäkkeiden lukumäärän perusteella.

▼B

1.4 MENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelu**

1.4.1.1 *Solut*

Tässä testissä voidaan käyttää useita eri solutyyppejä, kuten L5178Y-, CHO-, CHO-AS52-, V79- tai TK6-solulinjojen subklooneja. Tässä testissä on käytettävä solutyyppejä, joiden on osoitettu olevan herkkiä kemiallisille mutageeneille ja joilla on hyvä kloonaustehokkuus ja stabiili spontaanimutaatiotaajuus. Solujen mahdollinen mykoplasmakontaminaatio on tutkittava. Kontaminoituneita soluja ei saa käyttää.

Testi on suunniteltava siten, että sillä on tietty herkkyys ja teho. Solujen lukumäärän, viljelmien ja käytettyjen tutkittavan aineen pitoisuuksien tulee olla näiden määriteltyjen parametrien mukaisia (14). Altistuksen jälkeen elossa olevien ja kussakin testivaiheessa käytettävien elinkykyisten solujen vähimmäismäärän tulee perustua spontaanimutaatiotaajuuteen. Yleisohje on. että solujen lukumäärän on oltava vähintään kymmenen kertaa spontaanimutaatiotaajuuden käänteisluvun suuruinen, vähimmäismääräksi suositellaan kuitenkin 10^6 solua. Käytetystä solujärjestelmästä on oltava riittävästi aikaisempaa tutkimustietoa, joka osoittaa, että testillä saadaan pysyvästi päteviä tuloksia.

1.4.1.2 *Kasvatusväliaineet ja viljelyolosuhteet*

Testissä on käytettävä soveltuvia kasvatusväliaineita ja inkubaatio-olosuhteita (kasvatusastiat, lämpötila, CO_2-pitoisuus ja kosteus). Kasvatusväliaineet on valittava käytettävän selektiojärjestelmän ja solutyypin mukaan. On erityisen tärkeää valita viljelyolosuhteet, jotka takaavat optimaalisen solukasvun ilmentymisaikana ja sekä mutanttien että ei-mutanttien solujen optimaalisen pesäkkeenmuodostuskyvyn.

1.4.1.3 *Viljelmien valmistelu*

Solut kasvatetaan varastoviljelmistä, kylvetään kasvatusväliaineeseen ja inkuboidaan 37 ºC:ssa. Viljelmät on ehkä puhdistettava aikaisemmista mutanteista soluista, ennen kuin niitä käytetään tässä testissä.

1.4.1.4 *Metabolinen aktivaatio*

Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä sopivan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (15) (16) (17) (18) tai fenobarbitonin ja ß-naftoflavonin (19) (20) yhdistelmällä, käsiteltyjen jyrsijöiden maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria.

Postmitokondriaalisen jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue lopullisessa kasvatusväliaineessa on 1–10 % v/v. Metabolisen aktivaatiojärjestelmän valinta tai sen pois jättäminen saattaa riippua siitä, mihin kemiallisten aineiden ryhmään tutkittava aine kuuluu. Joissakin tapauksissa saattaa olla perusteltua käyttää useampaa kuin yhtä postmitokondriaalisen jakeen pitoisuutta.

▼B

Monilla uusilla menetelmillä, kuten yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotetuilla solulinjoilla, jotka ilmentävät spesifisiä aktivaatioentsyymejä, saattaa olla endogeenista aktivaatiovaikutusta. Käytettyjen solulinjojen valinnan on oltava tieteellisesti perusteltua (esim. sytokromi P450 -isoentsyymin merkitys tutkittavan aineen metabolialle).

1.4.1.5 *Tulkittava aine/valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen solujen käsittelyä. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen solujen käsittelyä. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuotin/kantaja-aine ei saa olla sellainen, että sen voidaan epäillä reagoivan kemiallisesti tutkittavan aineen kanssa, eikä se saa vaikuttaa solujen elinkykyyn eikä S9-aktiivisuuteen. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Testattaessa aineita, jotka ovat epästabiileja vedessä, orgaanisten liuottimien tulisi olla vedettömiä. Vesi voidaan poistaa lisäämällä molekyylisiivilä.

1.4.2.2 *Altistuspitoisuudet*

Huomioon otettavia kriteerejä suurinta pitoisuutta määritettäessä ovat sytotoksisuus, liukoisuus testijärjestelmään ja pH:n tai osmolaliteetin muutokset.

Sytotoksisuus on määritettävä pääasiallisessa kokeessa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä käyttäen asianmukaisia solujen eheyden ja solukasvun indikaattoreita, kuten suhteellista kloonaustehokkuutta (eloonjääneisyyttä) tai suhteellista kokonaiskasvua. Sytotoksisuus ja liukoisuus saattaa olla hyödyllistä määrittää alustavassa kokeessa.

Vähintään neljää analysoitavissa olevaa pitoisuutta on käytettävä. Mikäli sytotoksisuutta esiintyy, näiden pitoisuuksien on katettava alue, jossa suurimmalla pitoisuudella on maksimaalinen myrkkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkkyvaikutusta, mikä tarkoittaa yleensä sitä, että pitoisuudet voivat poiketa toisistaan enintään kertoimella 2–√10. Mikäli suurin pitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, siihen liittyvän suhteellisen eloonjääneisyyden (suhteellisen kloonaustehokkuuden) tai suhteellisen kokonaiskasvun tulisi olla noin 10–20 % (mutta ei alle 10 %). Suhteellisen ei-sytotoksisia aineita testattaessa suurimman testattavan pitoisuuden tulisi olla 5 mg/ml, 5 µl/ml tai 0,01 M sen mukaan, mikä näistä on pienin.

▼B

Huonosti liukenevia aineita on testattava viljelyolosuhteissa liukoisuusrajaan asti tai sen yli. Liukenemattomuuteen viittaavat muutokset on määritettävä lopullisessa kasvatusväliaineessa, jolle solut altistetaan. Liukoisuus kannattaa arvioida sekä käsittelyn alussa että lopussa, sillä se voi muuttua koejärjestelmässä altistuksen aikana esimerkiksi solujen, S9:n, seerumin ym. vaikutuksesta. Liukenemattomuus voidaan havaita paljaalla silmällä. Sakan ei pitäisi vaikuttaa laskentaan.

1.4.2.3 *Kontrollit*

Jokaisessa kokeessa on käytettävä rinnakkaisia positiivisia ja negatiivisia (liuotin tai kantaja-aine) kontrolleja, sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä. Metabolista aktivaatiota käytettäessä positiivisena kontrollina on käytettävä sellaista kemiallista ainetta, joka vaatii aktivaatiota mutageenisen vasteen aikaansaamiseksi.

Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Metabolinen aktivaatio	Lokus	Aine	CAS-nro	EINECS-nro
Ei eksogeenista metabolista aktivaatiota	HPRT	etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
		etyylinitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (pienet ja suuret pesäkkeet)	metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3	200-625-0
	XPRT	etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
		etyylinitrosourea	759-73-9	212-072-2
Eksogeeninen metabolinen aktivaatio	HPRT	3-metyylikolantreeni	56-49-5	200-276-4
		N-nitrosodimetyyliamiini	62-75-9	200-549-8
		7,12-dimetyylibentsantraseeni	57-97-6	200-359-5
	TK (pienet ja suuret pesäkkeet)	syklofosfamidi	50-18-0	200-015-4
		syklofosfamidimonohydraatti	6055-19-2	
		bentso[a]pyreeni	50-32-8	200-028-5
		3-metyylikolantreeni	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-nitrosodimetvyliamiini (suurilla S-9-pitoisuuksilla)	62-75-9	200-549-S
		bentso[a]pyreeni	50-32-8	200-028-5

Muita sopivia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää, esim. jos käytettävissä on laboratoriokohtainen tietokanta 5-bromo-2'-deoksiuridiinista (CAS-nro 59-14-3, Einecs-nro 200-415-9), myös tätä vertailuainetta voidaan käyttää. Samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvien positiivisten kontrolliaineiden käyttöä tulisi harkita, mikäli niitä on käytettävissä.

▼B

Mukana on oltava myös negatiivisia kontrolleja, jotka koostuvat liuottimesta tai pelkästä kantaja-aineesta kasvatusväliaineessa ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja ryhmiä. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos aikaisemmat tiedot kontrollista osoittavat, ettei valitulla liuottimella ole haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.4.3 **Testin suorittaminen**

1.4.3.1 *Altistuminen tutkittavalle aineelle*

Lisääntyvät solut on altistettava testattavalle aineelle sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä. Altistusajan on oltava sopiva (tehokas aika on yleensä 3–6 tuntia). Altistusta voidaan jatkaa yhden tai useamman solusyklin ajan.

Kullekin testattavalle pitoisuudelle voidaan altistaa kaksi rinnakkaista viljelmää tai vain yksi viljelmä. Yksittäisiä viljelmiä käytettäessä pitoisuuksien määrää on suurennettava, jotta saadaan riittävä määrä viljelmiä analyysiä varten (esim. vähintään 8 analysoitavissa olevaa pitoisuutta). Rinnakkaisia negatiivisia (liuotin) kontrolliviljelmiä on käytettävä.

Kaasumaisia tai haihtuvia aineita on testattava asianmukaisin menetelmin, esimerkiksi suljetuissa kasvatusastioissa (21) (22).

1.4.3.2 *Eloonjääneisyyden, elinkykyisyyden ja mutaatiotaajuuden mittaaminen*

Altistusajan päätyttyä solut pestään ja viljellään eloonjääneisyyden määrittämiseksi ja mutanttifenotyypin ilmentymisen aikaansaamiseksi. Sytotoksisuuden mittaus aloitetaan yleensä altistusajan jälkeen määrittämällä viljelmien suhteellinen kloonaustehokkuus (eloonjääneisyys) tai suhteellinen kokonaiskasvu.

Jokainen lokus vaatii määrätyn minimiajan, jotta hiljattain aiheutettujen mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista (HPRT ja XPRT vaativat vähintään 6–8 vuorokautta ja TK vähintään 2 vuorokautta). Soluja kasvatetaan selektiivistä ainetta (aineita) sisältävillä alustoilla mutanttien lukumäärän määrittämiseksi ja ilman selektiivisiä aineita kloonaustehokkuuden määrittämiseksi. Elinkykyisyyden mittaaminen (käytetään mutaatiotaajuuden laskemiseen) aloitetaan altistusajan päätyttyä maljaamalla soluja ei-selektiivisessä kasvatusväliaineessa.

Jos tutkittavalla aineella saadaan positiivinen tulos L5178Y $TK^{+/-}$ -testissä, pesäkkeiden koko on määritettävä ainakin yhdessä koeviljelmässä (suurin positiivinen pitoisuus) ja negatiivisissa ja positiivisissa kontrolleissa. Jos tutkittavalla aineella saadaan negatiivinen tulos L5178Y $TK^{+/-}$ -testissä, pesäkkeiden koko on määritettävä negatiivisissa ja positiivisissa kontrolleissa. Pesäkkeiden koon määritys voidaan tehdä myös tutkimuksissa, joissa käytetään TK6$TK^{+/-}$ -testiä.

▼B

2. **TULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tulosten tulee sisältää tiedot sytotoksisuuden ja elinkykyisyyden määrityksistä, pesäkkeiden lukumäärästä ja mutaatiotaajuudesta altistetuissa viljelmissä ja kontrolliviljelmissä. Mikäli vaste on positiivinen L5178Y $TK^{+/-}$ -testissä, pesäkkeet lasketaan pienten ja suurten pesäkkeiden kriteeriä käyttäen vähintään yhdestä testattavan aineen pitoisuudesta (suurin positiivinen pitoisuus) ja negatiivisista ja positiivisista kontrolleista. Sekä suurten että pienten mutaatiopesäkkeiden molekulaarinen ja sytogeneettinen luonne on selvitetty yksityiskohtaisesti (23) (24). $TK^{+/-}$ -testissä pesäkkeet lasketaan käyttäen kriteereinä normaalin kasvun (suuri) ja hitaan kasvun (pieni) pesäkkeitä (25). Mutanteilla soluilla, joissa geneettinen vaurio on kaikkein suurin, on pitkittynyt kahdentumisaika, joten ne muodostavat pieniä pesäkkeitä. Tällaiset vauriot ulottuvat tyypillisesti kokonaisen geenin puuttumisesta karyotyypissä näkyviin kromosomipoikkeavuuksiin. Pienten mutaatiopesäkkeiden muodostuminen on yhdistetty suuria kromosomipoikkeavuuksia aiheuttaviin kemiallisiin aineisiin (26). Lievemmin vaurioituneet mutantit solut kasvavat yhtä nopeasti kuin parentaalisetkin solut ja muodostavat suuria pesäkkeitä.

Eloonjääneisyys (suhteelliset kloonaustehokkuudet) tai suhteellinen kokonaiskasvu on ilmoitettava. Mutaatiotaajuus on ilmoitettava mutanttien solujen lukumäärän suhteena eloonjääneiden solujen lukumäärään.

Viljelmäkohtaiset tulokset on ilmoitettava. Lisäksi yhteenveto kaikista tiedoista on ilmoitettava taulukkomuodossa.

Selvää positiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa. Epäselvät tulokset on selvitettävä jatkotestauksella mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa. Negatiiviset tulokset on vahvistettava tapauskohtaisesti. Ellei negatiivisten tulosten vahvistamista jossakin tapauksessa pidetä tarpeellisena, tämä päätös on perusteltava. Tutkimusparametrien muuttamista on harkittava epäselvien tai negatiivisten tulosten seurantakokeissa arvioitavien koeolosuhteiden monipuolistamiseksi. Mahdollisia muutettavia tutkimusparametreja ovat pitoisuusvälit ja metaboliset aktivaatiojärjestelmät.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten pitoisuuteen liittyvä tai toistettavissa oleva mutaatiotaajuuden suureneminen. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa. Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Tutkittava aine. jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä koejärjestelmässä.

▼B

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Nisäkässoluilla tehtävässä *in vitro* -geenimutaatiotestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa geenimutaatioita käytetyissä viljellyissä nisäkässoluissa. Toistettavissa oleva positiivinen pitoisuus-vastesuhde on kaikkein merkityksellisin. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa geenimutaatioita testatuissa viljellyissä nisäkässoluissa.

3. **RAPORTOINTI**

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Solut:

— tyyppi ja solujen lähde,

— soluviljelmien lukumäärä,

— siirrostusten lukumäärä tarvittaessa,

— soluviljelmien ylläpitomenetelmät tarvittaessa,

— mykoplasman puuttuminen.

Koeolosuhteet:

— pitoisuuksien ja viljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esim. sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset, mikäli tiedot ovat käytettävissä,

— kasvatusväliaineen koostumus, CO_2-pitoisuus,

— tutkittavan aineen pitoisuus,

— lisätyn kantaja-aineen ja tutkittavan aineen määrä,

— inkubaatiolämpötila,

— inkubaatioaika,

— altistuksen kesto.

— solutiheys altistuksen aikana,

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus, myös hyväksymiskriteerit,

— positiiviset ja negatiiviset kontrollit,

▼B

— ilmentymisajan pituus (myös kylvettyjen solujen lukumäärä ja jatkoviljelmät ja kasvatusväliaineen vaihtoajat tarvittaessa),

— selektiiviset aineet,

— kriteerit, joiden perusteella testit määritellään positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi,

— elinkykyisten ja mutanttien solujen laskentamenetelmät,

— pesäkkeiden määritelmät, kun pesäkkeen koko ja tyyppi on otettu huomioon (myös ”pienten” ja ”suurten” pesäkkeiden kriteerit tarvittaessa).

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— sakkautumisen merkit,

— tutkittavalle aineelle altistetun viljelmän pH ja osmolaliteetti, jos määritetty,

— pesäkkeen koko, jos määritetty, ainakin negatiivisista ja positiivisista kontrolleista,

— laboratorion valmiudet todeta pienet mutanttipesäkkeet L5178Y $TK^{+/-}$ -järjestelmässä, mikäli merkitystä,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— rinnakkaisista negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tulokset,

— aikaisemmat negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tutkimustulokset, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat,

— mutaatiofrekvenssi.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUTTA**

(1) Moore, M. M, DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (Eds.) (1987), *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis,* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E. H. Y. and Mailing, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro, Proc. Natl Acad. Sci.,* USA, 61, s. 1306–1312.

(3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res*., 94, s. 467–485.

(4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Lori, *Mutagenesis*, 4, s. 394–403.

▼B

(5) Aaron, C. S. and Stankowski. Jr. L. F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.,* 223, s. 121–128.

(6) Aaron, G S., Bolcsfoldi, G.. Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicitv Test Procedures, *Mutation Res.,* 312, s. 235–239.

(7) Scott, D, Galloway, S. M., Marshall, R. K., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicitv Under Extremc Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation *Res.,* 257, s. 147–204.

(8) Clive. D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.,* 115, s. 225–251.

(9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agcncy Gene-Tox Program, *Mutation Res.,* 196, s. 17–36.

(10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Standkowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.,* 189, s. 135–141.

(11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.,* 216, s. 9–17.

(12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Anaylses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.,* 160, s. 133–147.

(13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ — $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al. (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures,* Elsevier Science Publishers, New York, s. 239–268.

(14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* Kirkland, D. J., Ed., Cambridge University Press, s. 66–101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Rcsistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.,* 46, s. 365–373.

(16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 31, s. 347–364.

▼B

(17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. E. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat. Res.,* 59, s. 61–108.

(18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (198 3), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 113, s. 173–215.

(19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Catehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis,* 7, s. 175–177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation System, in: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing,,* de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

(21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooney, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents,* New York, Plenum, s. 91–103.

(22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Crown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis,* 5, s. 795–801.

(23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87, s. 51–55.

(24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C, Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant TFT^{r} Mutants of L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.,* 151, s. 161–174.

(25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.,* 229, s. 89–102.

(26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK$^{+/-}$ — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis,* 5, s. 609–614.

▼B

B.18. **DNA-VAURIO JA SEN KORJAANTUMINEN — UDS-TESTI NISÄKÄSSOLUVILJELMÄLLÄ**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄ

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

UDS-testissä (Unscheduled DNA Synthesis test) nisäkässolu altistetaan kemiallisille tai fysikaalisille tekijöille, minkä jälkeen näiden mahdollisesti vaurioittama DNA-segmentti leikkautuu irti ja poistuu kromosomista. Testi perustuu tritiumilla leimatun tymidiinin (^{3}H-TdR) sitoutumiseen nisäkässolun DNA:han solunjakautumissyklin S-vaiheen ulkopuolella. ^{3}H-TdR:n sitoutuminen voidaan todeta altistettujen solujen DNA:sta autoradiografisesti tai nestetuikelaskennalla. Testissä altistetaan primaarisia rotan maksasoluja tai nisäkässoluviljelmä tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. UDS-testi voidaan myös suorittaa *in vivo*.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

Tutkittava aine ja kontrolli- tai vertailuaineet on sekoitettava kasvatusalustaan tai liuotettava tai sekoitettava soveltuvaan kantaja-aineeseen ja sen jälkeen edelleen kasvatusalustaan testiä varten. Kantaja-aineen loppupitoisuus ei saa vaikuttaa solujen elinkykyyn.

Testissä voidaan käyttää primaarisia rotan maksasoluviljelmiä, primaarisia ihmisen lymfosyyttiviljelmiä tai pysyviä solulinjoja (esim. ihmisen diploidisia fibroblasteja).

Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että soveltuvan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa.

Koeolosuhteet

Soluviljelmien lukumäärä

Autoradiografiaa käytettäessä tarvitaan ainakin kaksi ja nestetuikelaskentaa käytettäessä kuusi (tai vähemmän, mikäli tämä on tieteellisesti perusteltua) soluviljelmää kutakin parametriyhdistelmää kohti.

▼B

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Kuhunkin kokeeseen on sisällyttävä samanaikaisia positiivisia ja negatiivisia (altistamattomia ja/tai kantaja-aineelle altistettuja) kontrolleja sekä ilman metabolista aktivaatiota että metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa.

Rotan maksasoluilla suoritettavan testin positiivisia kontrolleja voivat olla esimerkiksi 7,12-dimetyylibentsantraseeni (7,12-DMBA) tai 2-asetyyliaminofluoreeni (2-AAF). Pysyvien solulinjojen osalta 4-nitrokinoliini-N-oksidi (4-NQO) on esimerkki positiivisesta kontrollista, jota voidaan käyttää ilman metabolista aktivaatiota autoradiografisesti tai nestetuikelaskennalla suoritettavissa testeissä; N-dimentyylinitrosamiini puolestaan on esimerkki positiivisesta kontrolliyhdisteestä, jota käytetään metabolisten aktivaatiojärjestelmien läsnäollessa.

Altistuspitoisuudet

Tutkittava aine on testattava useana eri pitoisuutena, siten että käytetty pitoisuusalue mahdollistaa annos/vastesuhteen selvittämisen. Korkeimmalla pitoisuudella on oltava jonkinasteinen sytomyrkkyvaikutus. Huonosti veteen liukenevilla aineilla pitoisuus määräytyy liukoisuuden mukaan. Vesiliukoisten myrkyttömien aineiden korkein tutkittava pitoisuus on päätettävä tapauskohtaisesti.

Solut

Soluviljelmien kasvatuksessa on käytettävä soveltuvia kasvatusalustoja, CO_2-pitoisuuksia, lämpötiloja ja kosteusarvoja. Pysyvät solulinjat on tarkastettava ajoittain *Mycoplasma*-kontaminaation varalta.

Metabolinen aktivaatio

Primaarisissa maksasoluviljelmissä ei käytetä metabolista aktivaatiojärjestelmää. Pysyvät solulinjat ja lymfosyytit altistetaan tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että soveltuvan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa.

Testin suorittaminen

Soluviljelmien perustaminen

Testissä käytettävät pysyvät solulinjat erotetaan kantaviljelmistä esim. trypsiinin avulla tai ravistelemalla, kylvetään kasvatusastioihin sopivaan tiheyteen ja inkuboidaan 37 °C:ssa.

Rotan maksasoluista tehdään lyhytaikaisviljelmät antamalla vastaeroteltujen maksasolujen kiinnittyä kasvupinnalle soveltuvassa kasvualustassa.

Ihmisen lymfosyyttiviljelmät perustetaan soveltuvin menetelmin.

▼B

Soluviljelmien altistaminen tutkittavalle aineelle

Primaariset rotan maksasolut:

Vastaeristettyjä rotan maksasoluja altistetaan sopivan pituiseksi ajaksi tutkittavalle aineelle alustassa, joka sisältää ^{3}H-TdR:ä. Altistuksen jälkeen kasvatusalusta poistetaan kasvatusastiasta, ja solut huuhdellaan, fiksoidaan ja kuivataan. Objektilasit kastetaan autoradiografiaemulsioon (vaihtoehtoisesti voidaan käyttää valmista ”stripping”-filmiä) ja valottumisajan jälkeen lasit kehitetään, värjätään ja lasketaan.

Pysyvät solulinjat ja lymfosyytit:

Autoradiografiset menetelmät: Soluviljelmiä altistetaan sopivaksi ajaksi tutkittavalle aineelle, minkä jälkeen ne käsitellään ^{3}H-TdR:llä. Altistus- ja käsittelyajat määräytyvät tutkittavan aineen luonteen, metaboliajärjestelmien aktiivisuuden ja solutyypin mukaan. Maksimaalisen S-vaiheen ulkopuolisen DNA-synteesin (unscheduled DNA-synthesis) havaitsemiseksi tulee ^{3}H-TdR lisätä kasvatusalustaan yhtä aikaa kuin tutkittava aine tai muutama minuutti tutkittavalle aineelle altistuksen jälkeen. Tutkittavan aineen ja ^{3}H-TdR:n väliset mahdolliset vuorovaikutukset vaikuttavat valintaan näiden kahden menetelmän välillä. S-vaiheen ulkopuolisen DNA-synteesin ja semikonservatiivisen DNA-replikaation erottamiseksi toisistaan jälkimmäinen voidaan estää esimerkiksi käyttämällä kasvatusalustaa, josta puuttuu arginiini tai jonka seerumipitoisuus on alhainen tai joka sisältää hydroksiureaa.

S-vaiheen ulkopuolisen DNA-synteesin mittaaminen nestetuikelaskennan avulla: Ennen solujen altistamista tutkittavalle aineelle solunjakautumisen S-vaiheen alkaminen estetään edellä kuvatulla tavalla, minkä jälkeen altistaminen suoritetaan samoin kuin autoradiografiaa käytettäessä. Inkubaation jälkeen DNA eristetään soluista, ja DNA:n kokonaismäärä sekä sitoutuneen ^{3}H-TdR:n määrä mitataan.

On huomattava, että semikonservatiivisen DNA-replikaation estäminen ei ole tarpeen stimuloimattomissa ihmisen lymfosyyttiviljelmissä.

Analyysi

Autoradiografinen määritys

S-vaiheessa olevat tumat jätetään laskennan ulkopuolelle määritettäessä viljeltyjen solujen S-vaiheen ulkopuolista DNA-synteesiä. Kutakin tutkittavan aineen pitoisuutta kohti on laskettava vähintään 50 solua. Objektilasit on kooditettava ennen laskemista. Kultakin lasilta lasketaan useita sattumanvaraisesti valittuja, selvästi toisistaan erillään olevia näkökenttiä. Sytoplasmaan sitoutunut ^{3}H-TdR määritetään laskemalla kolme tuman suuruista sytoplasma-aluetta kustakin laskettavasta solusta.

Nestetuikelaskentaan perustuva määritys

Nestetuikelaskentaa käytettäessä on kutakin pitoisuutta ja kontrollia kohti oltava riittävä määrä rinnakkaisia soluviljelmiä.

▼B

Kaikki tulokset on varmistettava erillisellä kokeella.

2. TULOKSET

Tulokset on esitettävä taulukkomuodossa.

2.1 AUTORADIOGRAFINEN MÄÄRITYS

^{3}H-TdR:n sitoutuminen sytoplasmaan ja tuman kohdalla olevien valottuneiden pisteiden lukumäärä on esitettävä erikseen.

^{3}H-TdR:n sytoplasmaattisen sitoutumisen ja tumassa olevien valottuneiden pisteiden lukumäärän jakautumia voidaan kuvata keskiarvolla, mediaanilla ja moodilla.

2.2 NESTETUIKELASKENTAAN PERUSTUVA MÄÄRITYS

Ilmoitettaessa sitoutuneen ^{3}H-TdR:n määrää nestetuikelaskentaan perustuvassa määrityksessä tulee yksikkönä olla dpm/µg DNA. Sitoutuneen ^{3}H-TdR:n määrän jakautumaa kuvaamaan voidaan käyttää saatujen dpm/|µg DNA -lukemien keskiarvoa ja keskihajontaa.

Tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin.

3. RAPORTOINTI

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— käytetyt solut, solutiheys ja altistettujen jatkoviljelmien järjestysluku, soluviljelmien lukumäärä,

— soluviljelmien ylläpitomenetelmät, kuten kasvatusalusta, lämpötila ja CO_2-pitoisuus,

— tutkittu aine, kantaja-aine, testissä käytetyt pitoisuudet ja pitoisuuksien valinnassa käytetyt perusteet,

— metabolisten aktivaatiojärjestelmien yksityiskohtainen kuvaus,

— altistusohjelma,

— positiiviset ja negatiiviset kontrollit,

— käytetty autoradiografiamenetelmä,

— solunjakautumisen S-vaiheen estämisessä käytetyt menetelmät,

— DNA:n eristämisessä ja kokonais-DNA:n määrittämisessä käytetyt menetelmät nestetuikelaskentaan perustuvassa testissä,

— annos/vastesuhde mikäli mahdollista,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

▼B

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼B

B.19. **SISARKROMATIDIVAIHDOSTESTI**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Sisarkromatidivaihdostesti (Sister Chromatid Exchange, SCE) on lyhytaikainen testi kahdentuvan kromosomin sisarkromatidien kesken tapahtuvan DNA:n vaihtumisen toteamiseksi. Sisarkromatidivaihdoksessa tapahtuu DNA:n replikaatiotuotteiden vaihtumista kahden, ilmeisesti homologisen lokuksen välillä. Vaihtumistapahtumassa oletetaan DNA-ketjun katkeavan ja liittyvän uudelleen yhteen, vaikka ilmiön molekyylitason tapahtumia ei juuri tunneta. Sisarkromatidivaihdosten toteaminen edellyttää sisarkromatidien differentiaalileimausta, joka suoritetaan antamalla bromodeoksiuridiinin sitoutua kromosomaaliseen DNA:han kahden solusyklin ajan.

Nisäkässoluviljelmä altistetaan tutkittavalle aineelle tarpeen mukaan sekä ilman metabolista aktivaatiota että nisäkäsperäisen eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Soluviljelmää kasvatetaan kahden DNA:n replikaatiosyklin ajan alustassa, joka sisältää bromodeoksiuridiinia. Soluja käsitellään tämän jälkeen tumasukkulan muodostumisen inhibiittorilla (esim. kolkisiinilla) solujen pysäyttämiseksi mitoosin metafaasivaiheeseen (c-metafaasiin), minkä jälkeen solut kerätään ja niistä tehdään kromosomipreparaatit.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

— Testissä voidaan käyttää primaarisia soluviljelmiä, (ihmisen lymfosyyttejä) tai pysyviä solulinjoja (esim. kiinanhamsterin ovariosoluja). Solulinjat on tarkastettava *Mycoplasma*-kontaminaation varalta.

— Testissä on käytettävä soveltuvia kasvatusalustoja ja inkubaatioolosuhteita (esim. lämpötila, kasvatusastiat, CO_2- pitoisuus ja kosteus).

— Tutkittavat aineet voidaan sekoittaa kasvatusalustaan tai liuotettava tai sekoitettava soveltuviin kantaja-aineisiin ennen solujen altistamista. Kantaja-aineen loppupitoisuus kasvatusastiassa ei saa merkitsevästi vaikuttaa solujen elinkykyyn tai kasvunopeuteen, ja sen vaikutusta sisarkromatidivaihdosfrekvenssiin on seurattava kontrollikokeella, jossa altisteena on tutkittavan aineen kantaja-aine.

▼B

— Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että nisäkäsperäisen eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Jos käytetään solutyyppejä, joilla on itsessään kyky metaboloida vierasaineita, tämän metabolisen aktiivisuuden on oltava nopeudeltaan ja luonteeltaan tutkittavalle aineryhmälle soveltuva.

Koeolosuhteet

Soluviljelmien lukumäärä

Kutakin parametriyhdistelmää kohti on oltava ainakin kaksi rinnakkaista soluviljelmää.

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Kuhunkin kokeeseen on sisällyttävä sekä suoraan vaikuttavia että metabolista aktivaatiota vaativia positiivisia kontrolleja; myös kanta-ja-ainekontrollia on käytettävä.

Seuraavat ovat esimerkkejä aineista, joita voidaan käyttää positiivisina kontrolleina:

— suoraan vaikuttava aine:

  — etyylimetaanisulfonaatti,

— epäsuorasti vaikuttava aine:

  — syklofosfamidi

Tarvittaessa kokeessa voidaan lisäksi käyttää ylimääräistä positiivista kontrollia, joka kuuluu samaan kemiallisten aineitten ryhmään kuin tutkittava aine.

Altistuspitoisuudet

Tutkittava aine on testattava vähintään kolmena eri pitoisuutena, joiden keskinäiset erot ovat sopivat. Korkeimmalla pitoisuudella on oltava merkitsevä myrkkyvaikutus, mutta se ei saa silti estää riittävää solunjakautumista. Huonosti veteen liukenevilla aineilla pitoisuus määräytyy liukoisuuden mukaan. Vesiliukoisten myrkyttömien aineiden korkein tutkittava pitoisuus on päätettävä tapauskohtaisesti.

Testin suorittaminen

Soluviljelmien perustaminen

Testissä käytettävät pysyvät solulinjat erotetaan kantaviljelmistä esim. trypsiinin avulla tai ravistelemalla, kylvetään kasvatusastioihin sopivaan tiheyteen ja inkuboidaan 37 °C:ssa. Yksikerrosviljelmissä solujen lukumäärä kasvatusastiaa kohti on säädettävä siten, että viljelmien konfluenttisuus ei juuri ylitä 50 prosenttia solujen keräyshetkellä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää suspensioviljelmiä. Ihmisen lymfosyyttiviljelmät perustetaan heparinisoidusta verestä soveltuvin menetelmin, ja viljelmiä inkuboidaan 37 °C:ssa.

▼B

Altistus

Eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa olevat solut altistetaan sopivaksi ajaksi tutkittavalle aineelle; useimmissa tapauksissa 1–2 tuntia voi olla riittävä, mutta tietyissä tapauksissa altistusaikaa voidaan pidentää aina kahteen täyteen solunjakautumissykliin saakka. Solut, joilla ei itsessään ole riittävää kykyä metaboloida vierasaineita, on altistettava tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että soveltuvan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Altistuksen jälkeen solut huuhdellaan puhtaiksi tutkittavasta aineesta ja niitä viljellään kahden solunjakautumissyklin ajan bromodeoksiuridiinin läsnäollessa. Vaihtoehtoisesti solut voidaan altistaa samanaikaisesti tutkittavalle aineelle ja bromodeoksiuridiinille siten, että kokonaisviljelyaika on kaksi solunjakautumissykliä.

Ihmisen lymfosyytit altistetaan niiden ollessa semisynkronisessa kasvuvaiheessa.

Solut analysoidaan niiden ollessa toisessa altistuksen alkamisen jälkeisessä jakautumisvaiheessa, kun on varmistettu, että solunjakautumissyklin herkimmät vaiheet ovat altistuneet tutkittavalle aineelle. Bromodeoksiuridiinia sisältävän DNA:n fotolysoitumisen minimoimiseksi kaikkia bromodeoksiuridiinia sisältäviä soluviljelmiä on käsiteltävä pimeässä tai heikossa hehkulampun valossa solujen keräämiseen saakka.

Solujen kerääminen

Soluja käsitellään tumasukkulan muodostumisen inhibiittorilla (esim. kolkisiinilla) 1–4 tuntia ennen solujen keräämistä. Jokaisen viljelmän solut kerätään ja käsitellään erikseen kromosomipreparaattien valmistamiseksi.

Kromosomipreparaattien valmistus ja värjäys

Kromosomipreparaatit valmistetaan normaalein sytogeneettisin menetelmin. Objektilasien värjäys sisarkromatidivaihdosten osoittamiseksi voidaan tehdä useilla eri menetelmillä (esim. fluoresenssi + Giemsa-värjäys).

Analyysi

Analysoitavien solujen lukumäärä perustuu kontrolliviljelmien spontaaniin sisarkromatidivaihdosfrekvenssiin. Yleensä kustakin viljelmästä lasketaan ainakin 25 hyvin levinneen metafaasin sisarkromatidivaihdokset. Objektilasit koodataan ennen analyysiä. Ihmisen lymfosyyteistä analysoidaan ainoastaan 46 sentromeeriä sisältävät metafaasit. Pysyvistä solulinjoista analysoidaan ainoastaan metafaasit, joiden sentromeerien lukumäärä on moodi ± 2. Tuloksissa on ilmaistava, onko sentromeerin kohdalla havaittu leiman vaihtuminen tulkittu sisarkromatidivaihdokseksi vai ei. Tulokset on varmistettava erillisellä kokeella.

2. **TULOKSET**

Tulokset on esitettävä taulukkomuodossa. Sisarkromatidivaihdosten lukumäärä kussakin metafaasissa ja sisarkromatidivaihdosten keskimääräinen lukumäärä kromosomia kohti kussakin metafaasissa on kirjattava erikseen kunkin altistetun viljelmän ja kontrolliviljelmän osalta.

Tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin.

▼B

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— käytetyt solut, soluviljelmien ylläpitomenetelmät,

— koeolosuhteet: kasvatusalustojen koostumus, CO_2-pitoisuus, tutkitun aineen pitoisuus, käytetty kantaja-aine, inkubaatiolämpötila, altistusaika, käytetty tumasukkulan muodostumisen inhibiittori ja sen pitoisuus sekä käsittelyaika, käytetty nisäkäsperäinen aktivaatiojärjestelmä, positiiviset ja negatiiviset kontrollit,

— viljelmien lukumäärä parametriyhdistelmää kohti,

— kromosomipreparaattien valmistusmenetelmän yksityiskohtainen kuvaus,

— analysoitujen metafaasien lukumäärä (erikseen kustakin soluviljelmästä),

— sisarkromatidivaihdosten keskimääräinen lukumäärä solua kohti ja kromosomia kohti (erikseen kustakin soluviljelmästä),

— sisarkromatidivaihdosten laskentaperusteet,

— annostusten valintaperusteet,

— annos/vastesuhde mikäli mahdollista,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼B

B.20. **RESESSIIVI LETAALI -TESTI BANAANIKARPÄSELLÄ *(DROSOPHILA MELANOGASTER)***

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄ

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Resessiivi letaali -testillä voidaan todeta pistemutaatiot ja pienet deleetiot banaanikärpäsen ituradan soluissa. Testillä havaitaan mutaatiot noin 800:ssa X-kromosomin lokuksessa, jotka muodostavat noin 80 % kaikista X-kromosomin lokuksista. X-kromosomi puolestaan edustaa noin yhtä viidesosaa banaanikärpäsen koko haploidisesta perintöaineksesta.

Banaanikärpäsen X-kromosomissa tapahtuvat mutaatiot ilmenevät mutanttigeeniä kantavien koiraiden fenotyypissä. Jos mutaatio on hemitsygoottisena letaali, mutaation tapahtuminen voidaan päätellä siitä, että jälkeläissukupolvesta puuttuu toinen niistä kahdesta koirastyypistä, jotka normaalisti esiintyvät heterotsygoottisen naaraan jälkeläisten joukossa. Resessiivi letaali -testissä näitä ilmiöitä hyödynnetään spesifisiä markkereita ja uudelleen järjestynyttä geenimateriaalia sisältävien kromosomien avulla.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

K a n n a t

Testissä voidaan käyttää hyvin kuvaillun villikannan koiraita ja Muller-5-kannan naaraita. Myös muita sopivalla tavalla merkittyjä naaraskantoja, joilla on multippeleita inversioita X-kromosomeissa, voidaan käyttää.

T u t k i t t a v a a i n e

Tutkittava aine on liuotettava veteen. Veteen liukenemattomat aineet voidaan liuottaa tai sekoittaa soveltuviin kantaja-aineisiin (esim. etanolin ja Tween-60:n tai Tween-80:n seokseen) ja sen jälkeen laimentaa vedellä tai suolaliuoksella ennen kärpäsille antamista. Dimetyylisulfoksidin (DMSO:n) käyttöä kantaja-aineena tulee välttää.

▼B

Kärpästen lukumäärä

Testi on suunniteltava etukäteen määriteltyjen tilastollisten herkkyys- ja tehokkuusvaatimusten mukaisesti. Sopivalla kontrollikokeella todettu spontaanimutaatiofrekvenssi vaikuttaa suuresti analysoitavien altistettujen kromosomien lukumäärään.

Antotapa

Altistus voidaan toteuttaa antamalla altiste suun kautta, ruiskeena tai kaasu- tai höyryaltistuksena. Tutkittava aine voidaan syöttää sokeriliuoksessa. Tarpeen mukaan aineet voidaan liuottaa 0,7 % NaCl-liuokseen ja injektoida rintakehään tai vatsaan.

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Testiin on sisällytettävä negatiivisia (kantaja-ainekontrolleja) ja positiivisia kontrolleja. Jos kuitenkin on käytettävissä laboratoriokohtaiset oletusarvot (laboratory historical Control data), samanaikaisia negatiivisia kontrolleja ei tarvita.

Altistustasot

Testissä on käytettävä kolmea eri altistustasoa. Alustavassa tutkimuksessa voidaan tutkittavasta aineesta käyttää yhtä altistustasoa, jonka on oltava suurin siedetty pitoisuus tai pitoisuus, jolla on joitakin myrkkyvaikutuksia. Myrkyttömien aineitten kohdalla on käytettävä suurinta pitoisuutta, joka on käytännössä mahdollinen.

Testin suorittaminen

Villikoiraat (ikä 3–5 vrk) altistetaan tutkittavalle aineelle, minkä jälkeen niiden kunkin annetaan pariutua useiden Muller-5-kannan tai jonkin muun asianmukaisesti (multippeleilla X-kromosomi-inversioilla) merkityn kannan nuorten naaraiden kanssa. Naaraat vaihdetaan uusiin joka toinen tai kolmas vuorokausi koko sukusolusyklin kattamiseksi. Naaraiden jälkeläisten laskennalla havaittavat letaalivaikutukset voidaan luokitella valmiisiin siittiöihin, keski- tai myöhäisasteen spermatideihin, varhaisasteen spermatideihin, spermatosyytteihin ja spermatogonioihin kohdistuneista altistusvaikutuksista johtuviksi.

Edellä kuvatusta risteytyksestä saatujen heterotsygoottisten F_1-polven naaraiden annetaan kunkin pariutua (so. yksi naaras kussakin kasvatuspullossa) saman jälkeläisparven koiraiden kanssa. F_2-polvessa kukin kärpäsviljelmä tarkastetaan villikoiraiden puuttumisen toteamiseksi. Jos jokin viljelmä näyttää saaneen alkunsa sellaisesta F_1-naaraasta, joka on edellisestä polvesta saanut letaalimutaation sisältävän X-kromosomin (eli viljelmässä ei havaita lainkaan koiraita, joilla olisi altistettu X-kromosomi), tällaisen naaraan naaraspuoliset, saman genotyypin omaavat jälkeläiset on testattava, jotta nähdään, toistuuko letaalivaikutus seuraavassa sukupolvessa.

2. **TULOKSET**

Tulokset on taulukoitava siten, että niistä ilmenee testattujen X-kromosomien lukumäärä, steriilien koiraiden lukumäärä sekä kullakin altistuspitoisuudella ja pariutumisjaksolla havaittujen letaalikromosomien lukumäärä kullakin altistetulla koiraalla. Tuloksissa on ilmaistava myös letaalimutaatioiden lukumäärien jakautuma koirasta kohti. Nämä tulokset on varmistettava erillisellä kokeella.

▼B

Resessiivinen letaali -testien tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin. Resessiivisten letaalimutaatioiden kasaantuminen yhden koiraan kohdalle on otettava huomioon ja käsiteltävä soveltuvin tilastollisin menetelmin.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— kanta: käytetyt banaanikärpäskannat, hyönteisten ikä, altistettujen koiraiden lukumäärä, steriilien koiraiden lukumäärä, perustettujen F_2-viljelmien lukumäärä, jälkeläisiä tuottamattomien F_2-viljelmien lukumäärä, kussakin sukusolusyklin vaiheessa letaalimutaation saaneiden kromosomien lukumäärä,

— altistettavien ryhmien koon määrittelyssä käytetyt perusteet,

— koeolosuhteet: altistus- ja näytteenotto-ohjelman yksityiskohtainen kuvaus, altistustasot, tiedot myrkyllisyydestä, negatiiviset (liuotinkontrollit) ja mahdolliset positiiviset kontrollit,

— käytetyt letaalimutaation kriteerit,

— altistus/vastesuhde, jos mahdollista,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼B

B.21. **SOLUTRANSFORMAATIOTESTIT NISÄKÄSSOLUVILJELMILLÄ**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄ

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Nisäkässoluviljelmillä voidaan tutkia *in vitro* sellaisten aineitten aikaansaamia fenotyyppisiä muutoksia, jotka *in vivo* aiheuttavat pahanlaatuista transformaatiota. Laajassa käytössä olevia soluja ovat mm. C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE ja Fischer rotan solut. Testit perustuvat solujen morfologian muutoksiin, fokusten muodostukseen tai muutoksiin kasvukyvyn pehmytagarissa. On olemassa myös vähäisemmässä käytössä olevia testejä, joilla voidaan tutkia muita, karsinogeenisille aineille altistumisen aiheuttamia fysiologisia tai morfologisia muutoksia soluissa. Millään *in vitro* -testeissä havainnoidulla tulostapahtumalla ei ole osoitettu olevan suoraa mekaanista yhteyttä syövän syntyyn. Joillakin testeillä voidaan havaita tuumoripromoottoreiden muodostuminen. Sytomyrkyllisyys voidaan todeta havainnoimalla tutkittavan aineen vaikutusta soluviljelmien pesäkkeenmuodostuskykyyn (kloonaustehokkuuteen) tai kasvunopeuteen. Sytotoksisuuden mittauksen tarkoituksena on varmistaa, että altistustaso on toksikologisesti mielekäs, mutta kaikissa testeissä tätä mittausta ei voida käyttää transformaatiofrekvenssin laskemiseen, sillä eräät testit edellyttävät pitkää inkubaatiota ja/tai jatkomaljausta.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

S o l u t

Testeissä voidaan käyttää useita erilaisia solulinjoja tai primaarisoluja transformaatiotestistä riippuen. Tutkijan on varmistettava, että testissä käytettävissä soluissa ilmenee haluttu fenotyyppinen muutos tunnetuille karsinogeeneille altistamisen jälkeen ja että testin kelpoisuus ja luotettavuus on osoitettu ja kirjattu tutkijan omassa laboratoriossa.

K a s v a t u s a l u s t a

Kasvatusalustojen ja koeolosuhteiden on sovelluttava käytettävälle transformaatiotestille.

▼B

Tutkittava aine

Tutkittavat aineet voidaan sekoittaa kasvatusalustaan tai liuottaa tai sekoittaa soveltuvaan kantaja-aineeseen ennen solujen altistamista. Kantaja-aineen loppupitoisuus kasvatusalustassa ei saa vaikuttaa solujen elinkykyyn, kasvunopeuteen tai transformaatiofrekvenssiin.

Metabolinen aktivaatio

Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että soveltuvan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Jos käytetään solutyyppejä, joilla on itsessään kyky metaboloida vierasaineita, tämän metabolisen aktiivisuuden on oltava luonteeltaan tunnetusti soveltuva tutkittavalle aineryhmälle.

Koeolosuhteet

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Kuhunkin kokeeseen on sisällyttävä sekä suoraan vaikuttavia että metabolista aktivaatiota vaativia positiivisia kontrolleja; myös negatiivista kontrollia (kantaja-ainekontrollia) on käytettävä.

Seuraavassa esimerkkejä aineista, joita voidaan käyttää positiivisina kontrolleina:

— suoraan vaikuttavat aineet:

  — etyylimetaanisulfonaatti,

  — μ-propiolaktoni,

— metabolista aktivaatiota vaativat aineet:

  — 2-asetyyliaminofluoreeni,

  — 4-dimetyyliaminoatsobentseeni,

  — 7,12-dimetyylibentsantraseeni.

Tarvittaessa kokeessa voidaan lisäksi käyttää ylimääräistä positiivista kontrollia, joka kuuluu samaan kemiallisten aineitten ryhmään kuin tutkittava yhdiste.

Altistuspitoisuudet

Tutkittava aine on testattava useana eri pitoisuutena, joiden on saatava aikaan pitoisuudesta riippuva myrkkyvaikutus siten, että korkein pitoisuus aiheuttaa suuren solujen kuolleisuuden ja että alhaisimman pitoisuuden aiheuttama kuolleisuus on likimäärin sama kuin negatiivisen kontrollin aikaansaama. Huonosti veteen liukenevilla aineilla pitoisuus määräytyy liukoisuuden mukaan. Vesiliukoisten myrkyttömien aineiden korkein tutkittava pitoisuus on päätettävä tapauskohtaisesti.

▼B

Testin suorittaminen

Solujen altistusajan on oltava käytettävään testiin sopiva; jos altistusaika on pitkä, saattaa olla välttämätöntä sen kuluessa vaihtaa soluille tuore kasvatusalusta (ja mahdollisesti tuore metabolinen aktivaatioseos) sekä annostella tutkittava aine uudelleen. Solut, joilla ei itsessään ole riittävää kykyä metaboloida vierasaineita, on altistettava tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että soveltuvan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Altistuksen jälkeen solut huuhdellaan puhtaiksi tutkittavasta aineesta ja niitä viljellään olosuhteissa, jotka mahdollistavat tarkasteltavana olevan transformoituneen fenotyypin ilmaantumisen ja transformaatiofrekvenssin määrittämisen. Kaikki tulokset varmistetaan erillisellä kokeella.

2. **TULOKSET**

Tulokset on esitettävä taulukkomuodossa. Tarkka esitysmuoto riippuu käytetystä testistä, ja se voi sisältää esim. maljakohtaiset tulokset, positiivisten maljojen lukumäärät tai transformoituneiden solujen lukumäärät. Kuolleisuus mahdollisuuksien mukaan on ilmaistava prosenttiosuutena kontrolliviljelmien solujen lukumäärästä ja transformaatiofrekvenssi transformoituneiden solujen osuutena eloonjääneistä soluista. Tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— käytetty solutyyppi, soluviljelmien lukumäärä, soluviljelmien edelläpitomenetelmät,

— koeolosuhteet: tutkittavan aineen pitoisuus, käytetty kantaja-aine, inkubaatioaika, altistuksen kesto ja toistokerrat, solutiheys altistuksen aikana, käytetty eksogeeninen metabolinen aktivaatiojärjestelmä, positiiviset ja negatiiviset kontrollit, tarkasteltavana olleen fenotyypin kuvaus, mahdollisesti käytetty valikointimenetelmä, annostuksen valinnassa käytetyt perusteet,

— eloonjääneiden ja transformoituneiden solujen laskentamenetelmä,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼B

B.22. **DOMINOIVA LETAALITESTI JYRSIJÖILLÄ**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Dominoivat letaalivaikutukset aiheuttavat alkio- tai sikiökuolemia. Kun kemialliselle aineelle altistus aiheuttaa dominoivia letaalivaikutuksia, on syytä olettaa, että aineella on testattavan lajin sukusoluihin kohdistuvia vaikutuksia. Dominoivia letaalivaikutuksia pidetään yleisesti kromosomivaurioista (rakenteellisista ja numeerisista poikkeamista) johtuvina. Sikiökuolemat voivat myös johtua toksisista vaikutuksista, mikäli naaraat on altistettu.

Tässä testissä altistetaan tavallisesti urokset testattavalle yhdisteelle ja pariutetaan altistamattomien ennen pariutumattomien naaraiden kanssa. Sukusolujen eri asteita voidaan tutkia erikseen jaksottamalla pariuttamisvälit. Kuolleiden munasolujen lisääntyminen testiryhmän naarasta kohden verrattuna kontrolliryhmän naaraisiin osoittaa munasolun kohdun seinämään kiinnittymisen jälkeen tapahtuneet menetykset. Ennen sitä tapahtuneet menetykset voidaan arvioida laskemalla munasarjojen keltarauhaset tai vertaamalla kiinnittyneiden munasolujen kokonaismäärää naarasta kohden testiryhmässä ja kontrolliryhmässä. Dominoiva kokonaisletaalivaikutus on ennen ja jälkeen kiinnittymisen kuolleitten munasolujen yhteismäärä. Se lasketaan vertaamalla elävien kohdun seinämään kiinnittyneiden munasolujen määrää testiryhmän naarasta kohden vastaavasti kontrolliryhmän naarasta kohden. Tietyin väliajoin tapahtuva määrän väheneminen voi johtua solujen (spermatosyyttien ja spermatogonioiden) kuolemasta.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

Jos mahdollista, testattavat aineet olisi liuotettava tai seostettava isotoniseen suolaliuokseen. Veteen liukenemattomat kemikaalit liuotetaan sopivia liuottimia käyttäen. Liuottimella ei saa olla testattavaan kemikaaliin kohdistuvia vaikutuksia eikä myrkkyvaikutuksia. Käyttöliuoksen on oltava vastavalmistettua.

▼B

Koe-olosuhteet

Antotapa

Testattava yhdiste annetaan tavallisesti yhtenä annoksena. Toistuvaa annostelua voidaan käyttää, jos aineen tiedossa olevat myrkkyvaikutukset edellyttävät sitä. Tavanomaiset antotavat ovat suun kautta ruokintaletkulla ja vatsaontelonsisäinen ruiske. Muitakin antotapoja voidaan käyttää.

Koe-eläimet

Rotta tai hiiri on suositeltavin eläinlaji. Terveet, täysin sukukypsät eläimet jaetaan satunnaisesti tutkimus- ja kontrolliryhmiin.

Lukumäärä ja sukupuoli

Altistettujen urosten lukumäärästä päätettäessä on otettava huomioon määritettävänä olevan biologisen ominaisuuden spontaani vaihtelu. Lukumäärän on perustuttava ennalta määritettyyn toteamisherkkyyteen ja merkitsevyyteen. Tyypillisessä testissä on uroksia kussakin annosryhmässä oltava niin monta, että 30-50 naarasta tulee kantavaksi kunkin pariutumisajan kuluessa.

Negatiivisten ja positiivisten kontrollien käyttö

Kuhunkin testiin on yleensä liitettävä positiivinen ja negatiivinen (liuotin) kontrolli. Jos kokeen suorittavassa laboratoriossa on käytettävissä äskettäin tehtyjen kokeiden positiivisia kontrollituloksia, näitä voidaan käyttää meneillään olevan testin positiivisen kontrollin asemesta. Positiivia kontrolliaineita on käytettävä alhaisina annoksina (esimerkiksi MMS:ää vatsaontelon sisäisesti 10 mg/kg) osoittamaan testiherkkyyttä.

Annostasot

Tavallisesti käytetään kolmea annostasoa. Korkeimman annoksen olisi aiheutettava altistetuissa koe-eläimissä myrkkyoireita tai lisääntymiskyvyn alenemista. Eräissä tapauksissa pelkästään korkein kertaannos saattaa olla riittävä.

Raja-annostesti

Myrkyttömiä aineita käytetään 5 g/kg, kun annoskertoja on yksi, tai 1 g/kg/päivä, kun annostelu on toistuvaa.

Testin suorittaminen

Altistustapoja on useita. Testattavan aineen antaminen kerta-annoksena on yleisimmin käytetty tapa. Muitakin tapoja voidaan käyttää.

Yksittäiset urokset pariutetaan peräkkäin yhden tai kahden altistamattoman ja astuttamattoman naaraan kanssa määräajoin altistuksen jälkeen. Naaraita on pidettävä uroksen luona vähintään yhden estrussyklin ajan tai kunnes pariutumisen on todettu tapahtuneen emättimessä esiintyvän sperman tai emätintulpan perusteella.

▼B

Altistustapa määrää altistamisen jälkeen tapahtuvien pariutumisten määrän. Pariutumisia olisi oltava niin monta, että kaikista sukusoluasteista saadaan näytteet altistuksen jälkeen.

Naaraat lopetetaan tiineyden puolenvälin jälkeen ja kohdusta lasketaan kuolleet ja elävät sikiöt. Munasarjoista voidaan laskea keltarauhasten määrä.

2. **TULOKSET**

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta ilmenee urosten ja kantavien naaraiden sekä hedelmöittymättömien naaraiden lukumäärä. Jokaisen pariutumisen tulos esitetään kunkin yksittäisen uroksen ja naaraan osalta. Naaraiden osalta kirjataan pariutumisviikko, uroksen saama annostaso, elävien ja kuolleiden alkioiden luku.

Dominoivaa kokonaisletaalivaikutusta määritettäessä testiryhmän ja kontrolliryhmän kunkin naaraan elävien alkioiden määrää vertaillaan keskenään. Testiryhmän kuolleiden alkioiden suhde eläviin verrattuna kontrolliryhmän vastaavaan suhteeseen analysoidaan munasolun kohdun seinämään kiinnittymisen jälkeen tapahtuneiden menetysten määrittämiseksi.

Jos aineisto on käsitelty siten, että tuloksina ilmoitetaan varhaiset ja myöhäiset kuolemat, tämä on ilmoitettava taulukoissa selvästi. Jos menetykset ennen kohdun seinämään kiinnittymistä on arvioitu, tämä on ilmoitettava. Ennen kiinnittymistä tapahtuneet menetykset voidaan määrittää keltarauhasten ja munasolujen määrän välisenä erona tai kiinnittymisten määränä kohtua kohden kontrolliryhmän pariutumistuloksiin verrattuna.

Tulosten merkitsevyys arvioidaan soveltuvin tilastollisin menetelmin.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— koe-eläinten laji, kanta, ikä ja paino, eläinten lukumäärä sukupuolta kohden koe- ja kontrolliryhmissä,

— testattava aine, liuotin, käytetyt annostasot ja annostasojen valintaperusteet, negatiiviset ja positiiviset kontrollit, tiedot myrkyllisyydestä,

— altistustie ja annostelutapa,

— pariutumisaikataulu,

— pariutumisen toteamistapa,

— eläinten lopettamisaika,

— dominoivien letaalitekijöiden määritysperusteet,

— annos/vastesuhde, jos sovellettavissa,

▼B

— tilastollinen arviointi,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼B

B.23. NISÄKKÄIDEN SPERMATOGONIOIDEN KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 48 3, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Tämän nisäkkäiden spermatogonioilla tehtävän *in vivo* -kromosomipoikkeavuustestin tarkoituksena on tunnistaa aineet, jotka aiheuttavat rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia nisäkkäiden spermatogonioissa (1) (2) (3) (4) (5). Rakenteelliset poikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Kemiallisten mutageenien aiheuttamat poikkeavuudet ovat useimmiten kromatidityyppisiä, mutta myös kromosomityyppisiä poikkeavuuksia esiintyy. Tätä menetelmää ei ole suunniteltu numeeristen poikkeavuuksien mittaamiseen, eikä sitä käytetä rutiinimaisesti tähän tarkoitukseen. Kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat ovat syynä moniin ihmisen geneettisiin sairauksiin.

Tämä testi niittaa kromosomipoikkeavuuksia spermatogoniaalisissa itusoluissa, joten sen odotetaan voivan ennustaa itusolujen periytyviä mutaatioita.

Testissä käytetään yleensä jyrsijöitä. Tämä *in vivo* -sytogeneettinen testi paljastaa kromosomipoikkeavuudet spermatogonioiden mitooseissa. Tällä menetelmällä ei tutkita muita kohdesoluja.

Spermatogonioiden kromatidityyppisten poikkeavuuksien havaitsemiseksi on tutkittava ensimmäistä mitoottista solunjakautumista altistuksen jälkeen, ennen kuin nämä leesiot häviävät myöhemmissä solunjakautumisissa. Altistetuista spermatogoniaalisista kantasoluista voidaan saada lisätietoja tekemällä meioottisia kromosomianalyysejä kromosomityyppisten poikkeavuuksien toteamiseksi diakineesi-metafaasi I:ssä altistettujen solujen muuttuessa spermatosyyteiksi.

Tällä *in vivo* -testillä pyritään selvittämään, vaikuttavatko somaattisten solujen mutageenit myös itusoluihin. Spermatogonioilla tehtävä testi soveltuu myös mutageenisuuden vaaran arvioimiseen, sillä siinä voidaan ottaa huomioon tekijöitä, jotka liittyvät *in vivo* metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin.

Kiveksissä on yhtaikaa monia spermatogonioiden sukupolvia, joiden herkkyys kemiallisten aineiden vaikutuksille vaihtelee. Havaitut poikkeavuudet edustavat siten käsiteltyjen spermatogoniopopulaatioiden kokonaisvastetta, jossa hallitsevassa asemassa ovat muita suurempina määrinä esiintyvät erilaistuneet spermatogoniot. Eri sukupolviin kuuluvien spermatogonioiden yhteys yleiseen verenkiertoon riippuu niiden sijainnista kiveksissä. Kaikki spermatogoniot eivät ole yhteydessä verenkiertoon Sertolin solujen muodostaman fysikaalisen ja fysiologisen esteen ja veri-kivesesteen vuoksi.

Jos on saatu viitteitä siitä, että tutkittava aine tai sen reaktiivinen metaboliitti ei pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä samassa kohdassa.

Aukko: gap, akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys, ja johon liittyy minimaalinen kromatidien siirtymä.

Numeerinen poikkeavuus: testissä käytetyille eläimille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

Polyploidia: haploidisen kromosomimäärän (n) esiintyminen moninkertaisena, muu kuin diploidinen kromosomimäärä (3n, 4n jne.).

Rakenteellinen poikkeama: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijänvaihdoksina.

1.3 TESTIN PERIAATE

Eläimet altistetaan tutkittavalle aineelle soveltuvaa altistusreittiä käyttäen ja lopetetaan sopivan ajan kuluttua altistuksesta. Ennen lopettamista eläimille annetaan ainetta, joka pysäyttää solunjakautumisen metafaasiin (esim. kolkisiini tai Colcemid®). Tämän jälkeen itusoluista valmistetaan kromosomipreparaatit ja ne värjätään, ja metafaasissa olevista soluista analysoidaan kromosomipoikkeavuudet.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelu**

1.4.1.1 *Eläinlajin valinta*

Yleisesti käytettyjä eläinlajeja ovat kiinanhamsteri- ja hiiriurokset. Myös muiden soveltuvien nisäkäslajien uroksia voidaan käyttää. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään ± 20 % keskipainosta.

1.4.1.2 *Asuinolot ja ruokinta*

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B Yleisjohdannossa mainitut, mutta kosteustavoitteen on oltava 50–60 %.

1.4.1.3 *Eläinten valmistelu*

Terveet nuoret täysikasvuiset urokset jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti. Eläimiä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen aloittamista.

▼B

1.4.1.4 *Annosten valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin niitä annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin /kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli mahdollista.

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen testiin on otettava mukaan rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrollien tulisi aiheuttaa spermatogonioissa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia *in vivo* altistustasoilla, joiden odotetaan aiheuttavan havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna.

Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Positiivinen kontrolliaine voidaan antaa eri reittiä pitkin kuin testattava aine ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Lisäksi positiivisina kontrolleina tulisi käyttää samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvia aineita, mikäli mahdollista. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
syklofosfamidi syklofosfamidimonohydraatti	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
sykloheksyyliamiini	108-91-8	203-629-0
mitomysiini C	50-07-7	200-008-6
monomeerinen akryyliamidi	79-06-1	201-173-7
trietyleenimelamiini	51-18-3	200-083-5

Pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta saaneista negatiivisista kontrolleista, joita muuten on käsitelty samalla tavoin kuin koeryhmiä, on otettava näytteet jokaisella näytteenottokerralla, paitsi jos aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että eläinten väliset erot ja vaihtelut kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistaajuudcssa ovat hyväksyttävällä tasolla. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos kontrolleilla aikaisemmin tehdyt tutkimukset tai julkaistut tulokset osoittavat, että valittu liuotin/kantaja-aine ei aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

▼B

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä**

Jokaisessa koe- ja kontrolliryhmässä on oltava vähintään 5 analysoitavissa olevaa urosta.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Tutkittavia aineita tulisi antaa mieluiten kerran tai kaksi kertaa (kerta-annoksena tai kahtena altistuksena). Ne voidaan antaa myös jaettuina annoksina eli kahtena altistuksena saman päivän aikana vain muutaman tunnin välein, mikä helpottaa suurten ainemäärien antamista. Muunlaiset annosteluohjelmat on perusteltava tieteellisesti.

Suurinta annosta saavassa ryhmässä käytetään kahta näytteenottokertaa altistuksen jälkeen. Koska tutkittava aine voi vaikuttaa solusyklin kinetiikkaan, näytteet kerätään yhtenä aikaisempana ja yhtenä myöhempänä ajankohtana noin 24–48 tunnin kuluttua altistuksesta. Muissa kuin suurimmassa annosryhmässä näytteet kerätään kerran 24 tunnin tai 1,5 solusyklin kuluttua altistuksesta, paitsi jos jonkin muun näytteenottoajankohdan tiedetään soveltuvan paremmin vaikutusten toteamiseen (6).

Näytteitä voidaan ottaa lisäksi myös muina ajankohtina. Varhaisemmat näytteenottoajat saattavat olla perusteltuja esimerkiksi testattaessa kemiallisia aineita, jotka voivat aiheuttaa kromosomien hidastumista (lagging) tai joilla saattaa olla S-vaiheesta riippumattomia vaikutuksia (1).

Toistuvien altistusten soveltuvuus on osoitettava tapauskohtaisesti. Toistuvan altistuksen jälkeen eläimet on lopetettava 24 tunnin (1,5 solusyklin) kuluttua viimeisestä altistuksesta. Tarvittaessa voidaan käyttää ylimääräisiä näytteenottokertoja.

Ennen lopettamista eläimille annetaan injektiona vatsaonteloon sopiva annos ainetta, joka pysäyttää solut metafaasivaiheeseen (esim. Colcemid®ia tai kolkisiinia). Elämistä otetaan näytteet sopivan ajan kuluttua tämän jälkeen. Hiirillä tämä väli on noin 3–5 tuntia: kiinanhamstereilla se on noin 4–5 tuntia.

1.5.3 **Annostasot**

Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää (7). Mikäli myrkkyvaikutuksia esiintyy, ensimmäiseen näytteenottoajankohtaan asti käytetään kolmea annostasoa. Näistä suurimmalla annoksella on oltava maksimaalinen myrkkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkkyvaikutusta. Myöhemmän näytteenottoajankohdan edellä voidaan käyttää vain suurinta annosta. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisyysoireita, että samaan annosteluohjelmaan perustuvien suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan.

▼B

Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit), saattavat edellyttää muita annoksenmäärityskriteerejä, ja ne pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkkyvaikutukseen viittaavia muutoksia spermatogonioissa (esim. spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäiseen ja toiseen meioottiseen metafaa-siin on pienentynyt; tämä pieneneminen ei saa olla yli 50 %).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2 000 mg eläimen painokiloa kohti vuorokaudessa (mg/kg/vrk) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivän aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostasojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä tai injektiona vatsaonteloon. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Koe-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

1.5.6 **Kromosomipreparaattien valmistus**

Heti eläinten lopettamisen jälkeen toisesta kiveksestä tai molemmista kiveksistä otetaan solususpensioita, jotka pannaan hypotoniseen liuokseen ja fiksoidaan. Tämän jälkeen solut levitetään objektilaseille ja värjätään.

1.5.7 **Analyysi**

Jokaista eläintä kohti tulisi analysoida vähintään 100 hyvin levinnyttä metafaasia (vähintään 500 metafaasia/ ryhmä). Tätä määrää voidaan pienentää, jos havaitaan runsaasti poikkeavuuksia. Kaikki objektilasit, myös positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta. Koska fiksaatiotoimenpiteet johtavat usein joidenkin metafaasien rikkoutumiseen ja kromosomien menetykseen, sentromeerien lukumäärän lasketuissa soluissa on vastattava lukua 2n ± 2.

2. **TULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Eläinkohtaiset tiedot on esitettävä taulukkomuodossa. Kokeellinen yksikkö on eläin. Jokaisesta yksittäisestä eläimestä on arvioitava rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ja kromosomipoikkeavuuksien lukumäärä solua kohti. Eri tyyppiset rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet on lueteltava, ja niiden lukumäärä ja esiintymistaajuus koe- ja kontrolliryhmien osalta on ilmoitettava. Aukot (gaps) rekisteröidään erikseen ja raportoidaan, mutta niitä ei yleensä lasketa mukaan kromosomipoikkeavuuksien kokonaistaajuuteen.

▼B

Jos havaitaan sekä mitoosia että meioosia, spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäiseen ja toiseen meioottiseen metafaasiin on määritettävä sytotoksisuuden mittana kaikista tutkittavalle aineelle altistetuista eläimistä ja negatiivisista kontrolleista yhteensä 100 jakautuvan solun näytteestä eläintä kohti mahdollisen sytotoksisen vaikutuksen osoittamiseksi. Jos tarkastellaan ainoastaan mitoosia, mitoosi-indeksi on määritettävä vähintään 1 000 solusta jokaista eläintä kohti.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten annoksesta riippuva kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen suhteellisen lukumäärän suureneminen tai kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärän selvä suureneminen yksittäisen annoksen osalta yhdellä näytteenottokerralla. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (8). Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa. Epäselviä tuloksia on selkeytettävä jatkotestauksella mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa.

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä testattavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Spermatogonioiden *in vivo* -kromosomipoikkeavuustestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin itusoluissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin itusoluissa.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä kohdekudokseen on pohdittava.

3. **RAPORTOINTI**

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta,

— eläinten lukumäärä ja ikä,

— hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.,

— eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

▼B

Koeolosuhteet:

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset,

— annostasojen valintaperusteet,

— antotavan valintaperusteet,

— tutkittavan aineen valmistelun yksityiskohdat,

— tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat,

— eläinten lopettamisajankohtien perustelut,

— ravintoon/juomaveteen sekoitetun tutkittavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk} tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta,

— yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteidenkeräysohjelmasta,

— myrkkyvaikutuksen mittausmenetelmät,

— metafaasin pysäyttämisessä käytetty aine, sen pitoisuus ja käsittelyn kesto,

— objektilasien valmistusmenetelmät,

— kromosomipoikkeavuuksien laskentakriteerit,

— analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti,

— kriteerit, joiden perusteella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— mitoosi-indeksi,

— spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäisiin ja toisiin meioottisiin metafaaseihin,

— kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ja lukumäärä, ilmoitettava jokaisen eläimen osalta erikseen,

— kromosomipoikkeavuuksien kokonaismäärä ryhmää kohti,

— kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ryhmää kohti,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— rinnakkaisten negatiivisten kontrollien tulokset,

— aikaisemmat negatiivisesta kontrollista saadut tutkimustulokset sekä vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat,

— rinnakkaisten positiivisten kontrollien tulokset,

— ploidian muutokset, jos niitä esiintyy.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

▼B

4. **KIRJALLISUUTTA**

(1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis,* Ramel, C, Lambert, B. and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, s. 477–484.

(2) Adler. I. D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IR.L Press, Oxford, Washington DC, s. 275–306.

(3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E., (1964), An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics,* 3, s. 289–294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res., 52, s. 207–209.

(6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, Mutation Res., 312, s. 313–318.

(7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 313–319.

(8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. report. Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184–232.

▼B

B.24. **HIIREN SPOT-TESTI**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄ

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Tässä hiirellä tehdyssä *in vivo* -testissä kehittyvät sikiöt altistetaan kemikaaleille. Kehittyvien sikiöiden kohdesolut ovat melanoblasteja ja kohdegeenit niitä, jotka säätelevät karvapeitteen karvojen pigmentaatiota. Kehittyvät sikiöt ovat heterotsygootteja useiden karvapeitteen värigeenien osalta. Melanoblastin tällaisen geenin dominoivan alleelin mutaatio tai (jonkin geneettisen tapahtuman aiheuttama) poistuma aiheuttaa resessiivisen fenotyypin ilmenemisen siitä syntyvissä soluissa, ja se näkyy värimuutostäplänä kehityksen lopputuloksena olevan hiiren turkissa. Täplikkäiden poikasten määrä ja mutaatioiden yleisyys kirjataan ja sitä verrataan ainoastaan liuottimelle sikiöasteella altistettuihin poikasiin. Hiiren spot-testillä voidaan määrittää sikiösolujen oletetut somaattiset mutaatiot.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

Jos mahdollista, testattavat kemikaalit liuotetaan isotoniseen suolaliuokseen. Veteen liukenemattomat kemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin. Liuottimella ei saa olla testattavaan yhdisteeseen kohdistuvia vaikutuksia eikä myrkkyvaikutuksia. Testattavia yhdisteitä on käytettävä vastavalmistettuina liuoksina.

K o e - e l ä i m e t

T-kantaa olevat hiiret (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) pariutetaan joko HT-kantaa (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) tai C57 BL-kantaa (nonagouti, a/a) olevien hiirten kanssa. Muitakin sopivia risteytyksiä, esimerkiksi NMRI-kantaa (nonagouti, a/a; albino, c/c) ja DBA-kantaa (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d), voidaan käyttää edellyttäen, että ne tuottavat nonagoutijälkeläisiä.

▼B

Lukumäärä ja sukupuoli

Riittävä määrä tiineitä naaraita altistetaan siten, että kutakin annostasoa kohden saadaan tarpeellinen määrä elossa olevia poikasia. Määrä riippuu altistetuissa hiirissä havaittujen täplien lukumäärästä ja kontrollitulosten kattavuudesta. Negatiivinen tulos voidaan hyväksyä ainoastaan, kun korkeimmalla annoksella käsiteltyjen naaraiden poikasia on tutkittu vähintään 300.

Negatiivisten ja positiivisten kontrollien käyttö

Tulokset kontrollitesteistä, joissa hiirille on annettu ainoastaan liuotinta (negatiivinen kontrolli) on oltava käytettävissä. Samasta laboratoriosta peräisin olevat aikaisempien kontrollitutkimusten tulokset voidaan yhdistää testin herkkyyden lisäämiseksi edellyttäen, että ne ovat yhtenäiset. Kokeensuorittavassa laboratoriossa olisi oltava käytettävissä positiivisia kontrollituloksia sellaisella kemikaalilla tehdyistä kokeista, jonka tiedetään tässä testissä osoittavan mutageenisuutta, ellei nyt testattavana oleva kemikaali osoittaudu mutageeniseksi.

Antotapa

Ainetta annetaan tiineille naaraille tavallisesti suun kautta ruokintaletkulla tai vatsaontelonsisäisenä ruiskeena. Altistus voidaan tarvittaessa tehdä hengitysteiden kautta ja muitakin antotapoja voidaan käyttää.

Annostasot

Testissä käytetään vähintään kahta annostasoa, joista toinen aiheuttaa myrkkyoireita tai pienentää poikueen kokoa. Myrkyttömiä kemikaaleja testattaessa on käytettävä mahdollisimman suurta annosta.

Testin suorittaminen

Kerta-annos annetaan yleensä raskauden 8., 9. tai 10. päivänä. Raskauden 1. päivä on emätintulpan havaitsemispäivä. Nämä päivät vastaavat 7,25, 8,25 ja 9,25 päivää hedelmöityksestä. Näiden päivien aikana voidaan antaa toistuvia annoksia.

Analyysi

Poikaset koodataan ja niiden täplikkyys tutkitaan 3–4 viikon ikäisinä. Täplät eritellään kolmeen ryhmään:

a) valkeat täplät 5 mm:n alueella vatsan keskiviivasta, joiden oletetaan aiheutuvan solukuolemista (WMVS);

b) keltaiset, agouti-tyyppiset täplät nisien ja sukupuolielinten yhteydessä, kaulassa, kainaloiden ja nivusten alueella ja otsan keskiosassa, joiden oletetaan aiheutuvan erilaistumisvirheistä (misdifferentiation, MDS); sekä

c) pigmentoidut ja valkeat sattumanvaraisesti karvapeitteessä esiintyvät täplät, joiden oletetaan aiheutuvan somaattisista mutaatioista (RS).

▼B

Kaikki kolme ryhmää kirjataan, mutta ainoastaan viimeinen, RS, on geneettisesti merkitsevä. MDS- ja RS-täplät voidaan erottaa toisistaan tutkimalla näytekarvat fluoresoivalla mikroskoopilla.

Poikasten selvästi näkyvät morfologiset poikkeamat on kirjattava.

2. **TULOKSET**

Tuloksina ilmoitetaan tutkittujen poikasten kokonaismäärä sekä niiden poikasten määrä, joissa esiintyy yksi tai useampia oletetusta somaattisesta mutaatiosta johtuvia täpliä. Altistus- ja kontrollitulosten vertailu suoritetaan jollakin soveltuvalla menetelmällä. Tulokset esitetään myös poikuekohtaisesti.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— risteytyksessä käytetyt kannat,

— tiineiden naaraiden lukumäärä koe- ja kontrolliryhmissä,

— poikueiden keskikoko koe- ja kontrolliryhmissä syntymähetkellä ja vieroituksen tapahtuessa,

— testattavan kemikaalin annostaso(t),

— käytetty liuotin,

— tiineyspäivä, jolloin annos annettiin,

— annostelutapa,

— poikasten kokonaismäärä sekä koe- ja kontrolliryhmissä esiintyneiden WMVS-, MDS- ja RS-ryhmän täplikkäiden poikasten lukumäärä,

— näkyvät morfologiset poikkeamat,

— RS-ryhmän osalta annos/vastesuhde, jos mahdollista,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼B

B.25. **HIIREN PERIYTYVÄ TRANSLOKAATIO**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄ

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Hiiren periytyvä translokaatiotesti tutkii nisäkkäiden sukusolujen rakenteellisia ja lukumääräisiä kromosomimuutoksia ensimmäisen polven jälkeläisistä. Havaittuja kromosomimuutoksia ovat vastavuoroiset translokaatiot sekä X-kromosomin häviämät naaraspuolisissa jälkeläisissä. Translokaatiokantajat ja XO-naaraat osoittavat hedelmällisyyden alenemista, jonka perusteella F_1-jälkeläiset valitaan sytogeneenisuustutkimuksiin. Eräät translokaatiotyypit aiheuttavat täydellisen steriliteetin (X-autosomi ja c-t-tyyppi). Translokaatioita tutkitaan sytogeneettisesti joko F_1-urosten tai F_1-naaraiden urospuolisten poikasten meioottisista diakineesi-metafaasi I -vaiheessa olevista soluista. XO-naaraat tunnistetaan sytogeneettisesti siitä, että niillä on ainoastaan 39 kromosomia luuydinmitoosissa.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

Testattavat kemikaalit liuotetaan isotoniseen suolaliuokseen. Veteen liukenemattomat kemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin. Jos käytetään liuotinta annostelun helpottamiseksi, sillä ei saa olla testattavaan yhdisteeseen kohdistuvia vaikutuksia eikä myrkkyvaikutuksia.

Antotapa

Altistus suoritetaan tavallisesti suun kautta ruokintaletkulla tai vatsaontelonsisäisenä ruiskeena. Muitakin antotapoja voidaan käyttää.

Koe-eläimet

Testit suoritetaan hiirillä, koska niiden kasvatus ja solututkimukset eivät aiheuta ongelmia. Kantaa ei ole määrätty. Kannan keskimääräisen poikuekoon on kuitenkin oltava yli kahdeksan ja pysyä suhteellisen vakiona.

Koe-eläiminä käytetään terveitä sukukypsiä hiiriä.

▼B

Eläinten lukumäärä

Tarvittavien eläinten määrä riippuu spontaanin translokaation esiintymistiheydestä ja minimiannoksesta, joka tarvitaan positiivisen tuloksen aikaansaamiseksi.

Testi suoritetaan yleensä analysoimalla F_1-urospuolisia jälkeläisiä. Vähintään 500 F_1-sukupolven urospuolista jälkeläistä on tutkittava kutakin annosryhmää kohden. Mikäli myös F_1-sukupolven naaraspuoliset jälkeläiset kuuluvat tutkimuksen piiriin, tarvitaan 300 naarasta ja 300 urosta.

Negatiivisten ja positiivisten kontrollien käyttö

Käytettävissä on oltava riittävästi sekä meneillään olevista että aikaisemmista tutkimuksista saatuja kontrollituloksia. Mikäli testin suorittavassa laboratoriossa on käytettävissä äskettäin tehtyjen kokeiden positiivisia kontrollituloksia, näitä voidaan käyttää meneillään olevan kokeen positiivisen kontrollin asemesta.

Annostasot

Tutkimuksessa käytetään yhtä annostasoa. Se on yleensä korkein annos, joka aiheuttaa pienimmät havaittavissa olevat myrkkyvaikutukset, mutta ei vaikuta lisääntymiskäyttäytymiseen eikä eloonjäämiseen. Annos/vastesuhteen määrittämiseksi tarvitaan lisäksi kaksi alempaa annostasoa. Myrkyttömiä kemikaaleja testattaessa on käytettävä mahdollisimman suurta annosta.

Testin suorittaminen

Annostelu ja pariuttaminen

Käytettävissä on kaksi annostustapaa. Testattava aine annetaan yleensä kerta-annoksena. Testattavaa ainetta voidaan myös antaa viikon jokaisena päivänä 35 päivän aikana. Annostelutapa määrää altistusta seuraavien pariuttamisten määrän. On tärkeää, että kaikista sukusoluasteista saadaan näyte. Pariuttamisajan lopussa naaraat siirretään yksittäishäkkeihin. Kun naaraat synnyttävät, synnytyspäivä, poikueen koko ja jälkeläisten sukupuoli kirjataan. Kaikki urospuoliset jälkeläiset vieroitetaan ja naaraspuoliset lopetetaan, elleivät ne kuulu tutkimuksen piiriin.

Translokaation heterotsygoottisuustesti

Jompaakumpaa jäljempänä esitetyistä menetelmistä voidaan käyttää:

— F_1-jälkeläisten hedelmällisyystutkimus ja sen jälkeen translokaatiokantajien varmistus sytogeneettisen analyysin avulla.

— Kaikkien F_1-urospuolisten jälkeläisten sytogeneettinen analyysi ilman edeltävää hedelmällisyystutkimusta.

a) Hedelmällisyystutkimus:

F_1-eläimen alentunut hedelmällisyys voidaan määrittää tutkimalla poikueiden kokoa ja/tai analysoimalla naaraiden kohdun sisältö.

Käytetyn hiirikannan normaalin ja alentuneen hedelmällisyyden arviointikriteerit on määritettävä.

▼B

Poikueen koon tutkiminen: testattavat F_1-urokset pannaan yksittäishäkkeihin samasta testistä tai samasta yhdyskunnasta peräisin olevien naaraiden kanssa. Häkit tutkitaan päivittäin 18 päivän kuluttua pariutumisesta alkaen. Synnytyksen tapahduttua poikueen koko ja F_2-jälkeläisten sukupuoli kirjataan ja poikueet hävitetään. Kun tutkitaan naaraspuolisia F_1-jälkeläisiä, pienten poikueiden F_2-jälkeläiset säilytetään jatkotutkimuksia varten. Naaraspuoliset translokaatiokantajat varmistetaan tekemällä sytogeneettinen translokaatioanalyysi jostakin niiden urospuolisesta jälkeläisestä. XO-naaraat tunnistetaan siitä, että niiden jälkeläisten sukupuolijakautuma 1:1 muuttuu suhteeksi 1:2 uroksia/naaraita. Sarjatutkimuksissa normaalien F_1-eläimien lisätutkimuksia ei suoriteta, jos ensimmäinen F_2-poikue on ennalta määritetyn normaalipoikueen kokoinen tai sitä suurempi. Muussa tapauksessa tutkitaan toinen tai kolmas F_2-poikue.

Niille F_1-eläimille, joita ei voida pitää normaaleina kolmen F_2-poikueen tutkimisen perusteella, suoritetaan lisätutkimuksia joko analysoimalla emojen kohdun sisältö tai tekemällä niistä suoraan sytogeneettinen analyysi.

Kohdun sisällön tutkiminen: translokaatiokantajien poikueiden pieneminen johtuu sikiökuolemista, joten kohdun seinämään kiinnittyneiden kuolleiden munasolujen suuri määrä viittaa tutkittavana olevassa eläimessä tapahtuneeseen translokaatioon. Kukin testattava F_1-uros pariutetaan kahden tai kolmen naaraan kanssa. Hedelmöitys varmistetaan joka aamu tutkimalla, onko naaraille kehittynyt emätintulppa. Naaraat lopetetaan 14–16 päivän kuluttua ja kohdussa olevien elävien ja kuolleiden alkioiden määrä kirjataan.

b) Sytogeneettinen analyysi:

Kivekset preparoidaan ilmakuivatusmenetelmää käyttäen. Translokaatiokantajat tunnistetaan primaarispermatogyyttien ensimmäisen diakineesimetafaasin multivalenttien rakennemuotojen perusteella. Vähintään kahdessa solussa esiintyvä multivalentti yhdistyminen on riittävä osoitus siitä, että tutkittava eläin on translokaatiokantaja.

Ellei siitosvalintaa ole tehty, kaikki F_1-urokset tutkitaan sytogeneettisesti. Vähintään 25 ensimmäisen diakineesimetafaasin solua on mikroskopoitava urosta kohden. Mitoosin metafaasit spermatogonioista tai luuytimestä on tutkittava F_1-uroksilta, joilla on pienet kivekset ja diakineesia edeltävä meioosin jakautumisvaihe F_1-naarailta, joiden epäillään olevan XO-naaraita. Epätavallisen pitkän ja/tai lyhyen kromosomin esiintyminen 10 solussa osoittaa steriiliä translokaatiota yksittäisessä uroksessa (c-tyyppi). Erääät urosten steriliteettiä aiheuttavat X-autosomi-translokaatiot voidaan todeta ainoastaan mitoottisten kromosomien raita-analyysin perusteella. Kun kaikissa 10 mitoosissa esiintyy 39 kromosomia, tämä osoittaa, että kysymyksessä on XO-naaras.

2. **TULOKSET**

Tulokset esitetään taulukkomuodossa.

Parentaalisukupolven poikueiden keskikoko ja sukupuolijakautuma syntymis- ja vieroitusajankohtana ilmoitetaan jokaista pariutumisjaksoa kohden.

▼B

F_1-eläinten hedelmällisyystutkimusten osalta ilmoitetaan kaikkien normaalien pariutumisten tuottamien poikueiden keskikoko ja F_1-translokaatiokantajien kunkin poikueen koko. Kohdun sisällön analyyseistä ilmoitetaan normaalien pariutumisten tuottamat elävät ja kuolleet kohdun seinämään kiinnittyneet munasolut ja F_1-translokaatiokantajien jokaisen pariutumisen tuottamat elävät ja kuolleet kohdun seinämään kiinnittyneet munasolut.

Ensimmäisen diakineesimetafaasin sytogeneettisistä analyyseistä ilmoitetaan multivalenttien raken-nemuutostyyppien määrät ja kokonaissolumäärä kutakin translokaatiokantajaa kohden.

Steriilien F_1-yksilöiden osalta ilmoitetaan pariutumisien kokonaismäärä ja pariuttamisajan kesto. Ilmoitetaan kivesten paino ja sytogeneettisen analyysin tulokset.

XO-naaraiden osalta ilmoitetaan poikueiden keskikoko, F_2-jälkeläisten sukupuolijakautuma sekä sytogeneettisen analyysin tulokset.

Jos mahdolliset F_1-translokaatiokantajat valittiin ennakolta hedelmällisyystutkimusten perusteella, taulukosta on ilmettävä, kuinka moni näistä varmistui translokaatioheterotsygootiksi.

Negatiiviset kontrollitulokset ja positiivisten kontrollitestien tulokset ilmoitetaan.

3. RAPORTOINTI

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— hiirikanta, eläinten ikä, altistettujen eläinten paino,

— parentaalieläinten lukumäärä sukupuolta kohden koe- ja kontrolliryhmissä,

— koeolosuhteet, tarkka kuvaus altistuksesta, annostasot, liuottimet, pariutumisaikataulu,

— poikasten lukumäärä ja sukupuoli naarasta kohden, translokaatioanalyysiä varten kasvatettujen poikasten lukumäärä ja sukupuoli,

— translokaatioanalyysin ajankohta ja perusteet,

— translokaatiokantajien lukumäärä ja tarkka selostus translokaatiokantajista, risteyttämisestä ja kohdun sisällöstä soveltuvin osin,

— sytogeneettiset menettelytavat sekä selostus mikroskooppisesta analyysistä mieluimmin kuvien kera,

— tilastollinen arviointi,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

▼B

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼B

B.26. **SUBKROONINEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTESTI TOISTETUILLA ANNOKSILLA TEHTÄVÄ 90 VUOROKAUDEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS JYRSIJÖILLÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 408 (1998).

1.1 JOHDANTO

Määritettäessä ja arvioitaessa kemikaalin myrkyllisyysominaisuuksia voidaan subkrooninen toistetuilla annoksilla aiheutettu suun kautta vaikuttava myrkyllisyys määrittää sen jälkeen, kun alustavia myrkyllisyyttä koskevia tietoja on saatu välittömän myrkyllisyyden testistä tai toistetuilla annoksilla suoritetusta 28 vuorokauden myrkvllisyystestistä. 90 vuorokauden tutkimuksesta saadaan tietoja terveyshaitoista, joita todennäköisesti seuraa toistuvasta altistuksesta pitkähkön ajanjakson aikana, myös vieroittamisen jälkeen eläimen kehittyessä ja kasvaessa täysikasvuiseksi. Tutkimuksessa saadaan tietoa tärkeimmistä myrkyllisyysvaikutuksista, siinä käyvät ilmi kohde-elimet ja aineen mahdollinen kertyminen ja siinä voidaan saada arvio haitattomista altistustasoista (NO-AEL), joita voidaan käyttää valittaessa annoksia pitkäaikaisten vaikutusten tutkimiseen sekä turvallisuuskriteerien asettamiseen ihmisten altistukselle.

Menetelmässä korostetaan neurologisia loppupisteitä, ja siinä saadaan tietoa immunologisista ja lisääntymisfysiologisista vaikutuksista. Menetelmässä korostetaan myös sitä, että eläimistä on tehtävä huolellisesti kliinisiä havaintoja, jotta saadaan mahdollisimman paljon tietoa. Tämän tutkimuksen avulla pitäisi olla mahdollista tunnistaa kemikaaleja, joilla voi olla perusteellisempia tutkimuksia vaativia myrkyllisiä vaikutuksia hermostoon, immuunijärjestelmään ja lisääntymiselimiin.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Annos: annetun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan painoyksikköinä (g, mg) tai testiaineen painona koe-eläi-men painoyksikköä kohti (esim. mg/kg) tai vakioina pidettävinä ruokavalion pitoisuuksina (ppm).

Annostelu: yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutaajuuden ja annostelun keston.

NOAEL: lyhennys määritelmälle ”no observed adverse effect level” eli korkein annostaso, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta annetaan suun kautta päivittäin asteittain suurenevina annoksina useille koe-eläinryhmil!e niin, että yhtä annostasoa annetaan ryhmää kohti 90 vuorokauden ajan. Tänä aikana eläimiä havainnoidaan tarkasti myrkkyvaikutusten havaitsemiseksi. Testin kuluessa kuolleille tai tapetuille eläimille tehdään ruumiinavaus, ja testin päättyessä myös vielä elossa olevat eläimet tapetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

▼B

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Eläinten valmistelu**

Testissä olisi käytettävä terveitä eläimiä, jotka on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden vuorokauden ajan ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja/tai ikä on tunnettava. Eläimet jaetaan satunnaistetusti kontrolli- ja käsittelyryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Kullekin eläimelle annetaan oma tunnistenumero.

1.4.2 **Annosten valmistelu**

Testiainetta annetaan letkuruokinnalla tai ravinnon tai juomaveden mukana. Menetelmä riippuu tutkimuksen tarkoituksesta ja testiaineen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista.

Tarvittaessa testiaine liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esim. maissiöljyyn) tehtävää liuosta tai emulsiota ja sitten mahdollisesti muita liuottimia. Jos liuotin on muu kuin vesi, sen myrkkyominaisuudet on tunnettava. Testiaineen stabiilisuus annosteluolosuhteissa olisi määritettävä.

1.4.3 **Testiolosuhteet**

1.4.3.1 *Koe-eläimet*

Rotta on suositeltava koe-eläin, vaikka muita jyrsijöitä, kuten hiirtä, voidaan myös käyttää. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa ja nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Annostelu on aloitettava mahdollisimman pian vieroittamisen jälkeen ja joka tapauksessa ennen kuin eläimet ovat yhdeksän viikon ikäisiä. Tutkimuksen alkaessa eläinten painot saavat erota toisistaan mahdollisimman vähän, enintään ± 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta. Jos tutkimuksen on tarkoitus olla alustava tutkimus pitkäaikaiselle myrkyilisyystutkimukselle, molemmissa tutkimuksissa olisi käytettävä samaa kantaa ja samalta toimittajalta hankittuja eläimiä.

1.4.3.2 *Määrä ja sukupuoli*

Kullakin annostasolla olisi käytettävä vähintään 20:tä eläintä (10 naarasta ja 10 koirasta). Jos eläimiä tapetaan kokeen aikana, määrän on oltava saman verran suurempi kuin ennen tutkimuksen päättymistä tapettavien eläinten määrä. Kemikaalista tai sitä läheisesti muistuttavasta aineesta saatavilla olevien aiempien tietojen perusteella olisi harkittava kymmenen eläimen (viisi kumpaakin sukupuolta) lisäryhmän sisällyttämistä kontrolliryhmään ja suurimman annoksen ryhmään sitä varten, että niitä havainnoitaisiin käsittelyjakson jälkeen mahdollisten myrkkyvaikutusten palautumisen tai jatkumisen havaitsemiseksi. Tämä käsittelyn jälkeinen aika olisi asetettava havaittujen vaikutusten mukaan.

▼B

1.4.3.3 *Annostasot*

Tutkimuksessa on käytettävä vähintään kolmea annostasoa ja testin kanssa samaan aikaan on tehtävä kontrolli paitsi jos tehdään raja-arvotesti (ks. 1.4.3.4). Annostasot voidaan asettaa toistetuilla annoksilla tehdyn testin tai raja-arvotestin tulosten perusteella, ja kaikki mahdolliset testiaineesta tai samanlaisista aineista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon. Mikäli testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso olisi valittava siten, että se on myrkyllinen, mutta ei johda kuolemaan eikä aiheuta suurta kärsimystä. Annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla. Kaksinkertaiset-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevassa annossarjassa, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin n. 6–10-ker-taisia).

Kontrolliryhmän on oltava käsittelemätön ryhmä tai kantaja-ainetta saava ryhmä, jos testiaineen antamiseen käytetään kantaja-ainetta. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta testiainetta. Jos käytetään kantaja-ainetta, kontrolliryhmälle on annettava testiainetta suurimmassa käytetyssä kantaja-aineen tilavuudessa. Jos testiaine annetaan ravinnon mukana ja siitä aiheutuu ravinnonoton vähenemistä, voi normaaliravintoa saava kontrolliryhmä olla hyödyllinen, jotta erotettaisiin maittavuudesta aiheutunut ravinnonoton väheneminen sellaisesta, joka aiheutuu testimallin toksikologisista muutoksista.

Seuraavat mahdollisen kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, aineenvaihduntaan tai testiaineen pidättymiseen (retentioon) elimistössä; sellaiset vaikutukset testiaineen kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkkyominaisuuksia; vaikutukset ravinnon tai veden nauttimiseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen.

1.4.3.4 *Raja-annostesti*

Ellei yhdellä annostasolla, joka on vähintään 1 000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) / vrk ja joka annetaan tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, havaita haittavaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Rajatestisääntöä sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

1.5 TESTIN SUORITUS

1.5.1 **Antotapa**

Eläimille annetaan testiainetta päivittäin seitsemänä päivänä viikossa 90 vuorokauden ajan. Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä, esim. testiainetta annetaan viitenä päivänä viikossa, se on perusteltava. Jos testiaine annetaan letkuruokinnalla, se on annettava yhtenä annoksena mahaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä. Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus riippuu koe-eläimen koosta. Tilavuus ei saisi olla suurempi kuin 1 ml/100 g painoa. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä paheneva suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

▼B

Kun aine annetaan ravinnon tai juomaveden kanssa, on tärkeää varmistaa, ettei testiainemäärä häiritse normaalia ravitsemusta tai vesitasetta. Kun testiaine annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa. Valittu vaihtoehto on mainittava. Kun aine annetaan letkulla, annos olisi annettava joka päivä suunnilleen samaan aikaan, ja sitä olisi säädettävä tarvittaessa, jotta annostaso voitaisiin pitää vakiona suhteutettuna eläimen painoon. Kun 90 vuorokauden testin on tarkoitus olla alustava testi ennen pitkäaikaisen myrkyllisyystestin suorittamista, olisi molemmissa testeissä käytettävä samanlaista ruokavaliota.

1.5.2 **Havainnot**

Havainnointiajan olisi oltava vähintään 90 vuorokautta. Pitkäaikaiseen havainnointiin tarkoitetun ryhmän eläimiä olisi pidettävä sopiva aika ilman käsittelyä, jotta voitaisiin osoittaa myrkkyvaikutusten pysyvyys tai eläinten toipuminen niistä.

Yleiset kliiniset havainnot olisi tehtävä vähintään kerran päivässä, mieluiten samaan kellonaikaan (samoihin kellonaikoihin). Tässä olisi otettava huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Eläinten kliininen tila on kirjattava. Kaikki eläimet tarkastetaan sairastavuuden ja kuolleisuuden havaitsemiseksi vähintään kahdesti päivässä, tavallisesti aamulla ja illalla.

Kaikista eläimistä olisi tehtävä yksityiskohtaiset kliiniset havainnot vähintään kerran ennen ensimmäistä altistusta (jotta eläimessä havaittavia muutoksia voidaan verrata alkutilaan) ja kerran viikossa sen jälkeen. Havainnointi olisi tehtävä niin, että eläin on häkin ulkopuolella, mieluiten vakioalueella ja suunnilleen samaan vuorokaudenaikaan. Havainnot olisi kirjattava huolellisesti, ja mieluiten olisi käytettävä testilaboratorion nimenomaisesti määrittelemää pisteytysmenctelmää. Olisi pyrittävä siihen, että havainnointiolosuhteissa olisi mahdollisimman vähän vaihtelua. Kirjattavia havaintoja olisivat mm. muutokset nahassa, turkissa, silmissä ja limakalvoissa, eritykset ja eritteet, autonominen aktiviteetti (esim. kyynelet, karvojen jäykistyminen, silmäterän koko, epätavallinen hengitys). Muutokset käynnissä, asennossa ja reagoimisessa käsittelyyn sekä kouristusliikkeet ja jäykkyys, kaavamaiset liikkeet (esim. liioiteltu siistiminen, toistuva ympyrää kulkeminen) tai omituinen käyttäytyminen (esim. itseään vahingoittaminen, takaperin kävely) olisi myös kirjattava (1).

Silmät olisi tutkittava oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testiaineen antamista ja testin lopussa mieluiten kaikilta koeeläimiltä ja ainakin suuren annoksen ryhmään ja kontrolliryhmään kuuluvilta. Jos silmissä havaitaan muutoksia, olisi tutkittava kaikki eläimet.

Altistusajanjakson loppua kohti, mutta ei aikaisemmin kuin viikolla 11 olisi tutkittava aistien reagointi erilaisiin ärsykkeisiin (1) (esim. kuulo-, näkö- ja proprioseptiiviset ärsykkeet) (2), (3), (4), tarttumisotteen voimakkuus (5) ja motorinen aktiivisuus (6). Lisätietoja käytettävistä menetelmistä annetaan vastaavissa viitteissä. Myös muita menetelmiä saa käyttää.

Tutkimuksen loppupuolella tehtäviä toiminnallisia havaintoja ei tarvitse suorittaa, jos muista tutkimuksista on saatavilla toiminnallisia havaintoja koskevia tietoja ja päivittäisissä kliinisissä havainnoissa ei ole tullut ilmi toiminnallisia vajavaisuuksia.

▼B

Poikkeuksellisesti toiminnallisia havaintoja ei tarvitse myöskään tehdä ryhmille, joissa havaitaan muita myrkkyvaikutuksia siinä määrin, että ne haittaisivat merkittävästi toiminnallista testiä.

1.5.2.1 *Eläimen paino ja ravinnon ja/tai veden nauttiminen*

Kaikki eläimet olisi punnittava vähintään kerran viikossa. Ravinnonotto olisi mitattava vähintään viikoittain. Jos testiaine annetaan juomaveden mukana, veden nauttiminen olisi myös mitattava vähintään viikoittain. Veden nauttimisen mittaamista voidaan harkita myös sellaisissa ruoka- tai letkuruokintatutkimuksissa, joiden aikana juomisessa voi esiintyä muutoksia.

1.5.2.2 *Hematologia ja kliininen biokemia*

Verinäytteet olisi otettava nimetystä paikasta ja säilytettävä tarvittaessa asianmukaisissa olosuhteissa. Testiajanjakson lopussa näytteet otetaan juuri ennen tappamista tai sen yhteydessä.

Verestä olisi tehtävä testiajanjakson lopussa ja aina, kun on otettu verinäytteitä, seuraavat määritykset: hematokriitti, hemoglobiinikonsentraatio, punasolujen määrä, valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erittelylaskenta, verihiutaleiden määrä ja veren hyytymisaika tai hyytymiskyky.

Kliinisen biokemian määritykset, joilla tutkitaan tärkeimpiä myrkkyvaikutuksia kudoksissa ja erityisesti munuaisissa ja maksassa, olisi tehtävä verinäytteistä, jotka on otettu kustakin eläimestä juuri ennen tappamista tai sen yhteydessä (lukuun ottamatta kuolleina löydettyjä ja/tai kesken koetta tapettuja). Samoin kuin hematologisia tutkimuksia varten myös kliinisen biokemian testejä varten voidaan näytteitä ottaa kokeen kestäessäkin. Suositellaan, että eläimet paastoaisivat yli yön ennen verinäytteiden ottoa ([1]). Plasmasta tai seerumista olisi määritettävä natrium, kalium, glukoosi, kokonaiskolesteroli, urea, veren ureatyppi, kreatiniini, kokonaisvalkuainen ja albumiini sekä enemmän kuin kaksi entsyymiä, jotka osoittavat maksasoluvaikutuksia {kuten alaniini-aminotransferaasi, asparagiinihappoaminotransferaasi, alkalinen fosfataasi, gamma-glutamiinihappotranspeptidaasi ja sorbitolidehydrogenaasi). Muitakin (maksan tai muiden elimien) entsyymejä ja sappihapot, jotka voivat antaa hyödyllistä tietoa tietyissä olosuhteissa, voidaan määrittää.

Seuraavat virtsamääritykset voidaan tehdä valinnaisesti tutkimuksen viimeisen viikon aikana (tällöin on mitattava virtsan keruuaika): ulkonäkö, tilavuus, osmolaalisuus tai ominaistiheys, pH, valkuainen, glukoosi ja veri ja/ tai verisolut.

Lisäksi olisi harkittava yleistä kudosvauriota osoittavien seerumissa esiintyvien merkkiaineiden määritystä. Muita määrityksiä, jotka olisi tehtävä, jos testiaineen tunnetut ominaisuudet saattavat vaikuttaa tai niiden epäillään vaikuttavan kyseisiin määrityksiin liittyvään aineenvaihduntaan, ovat kalsium, fosfori, paasto-triglyseridit, tietyt hormonit, methemoglobiini ja koliinicsteraasi. Tarvittavat määritykset olisi yksilöitävä tiettyihin luokkiin kuuluville kemikaaleille tai tapauskohtaisesti.

([1]) Monia seerumista ja plasmasta tehtäviä määrityksiä, esimerkiksi glukoosia varten olisi paasto yön yli suositeltava. Tärkeimmät syyt tähän ovat se, että ilman paastoa näytteissä olisi luonnollisesti paljon enemmän vaihtelua, mikä saattaisi peittää vähäisempiä vaikutuksia ja vaikeuttaa tulkintaa. Toisaalta paastoaminen yli yön saattaa häiritä eläinten yleistä aineenvaihduntaa ja myös päivittäistä altistamista testiaineelle erityisesti ruokintatutkimuksissa. Jos eläimet paastoavat yli yön, kliinisen biokemian määritykset olisi tehtävä sen jälkeen, kun on tehty toiminnalliset havainnot.

▼B

Kaiken kaikkiaan lähestymistavan on oltava joustava. Se riippuu eläinlajista ja aineen havaituista ja/tai odotetuista vaikutuksista.

Jos aiemmat tiedot ovat puutteelliset, olisi harkittava, täytyykö hematologisia ja kliinisen biokemian määrityksiä tehdä ennen annosten antamisen aloittamista. Yleensä ei suositella, että tällaisia tietoja tuotettaisiin ennen käsittelyä (7).

1.5.2.3 *Ruumiinavaustutkimukset*

Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Kaikkien eläinten (lukuun ottamatta kuolleina löydettyjä ja/tai kesken koetta tapettuja) maksa, munuaiset, lisämunuaiset, kivekset, lisäkivekset, kohtu, munasarjat, kateenkorva, perna, aivot ja sydän olisi puhdistettava muusta kudoksesta tapauksen mukaan, ja ne olisi punnittava mahdollisimman nopeasti avauksen jälkeen kuivumisen estämiseksi.

Seuraavat kudokset olisi säilöttävä sellaiseen kiinnitysväliaineeseen, joka sopii parhaiten kyseiselle kudostyypille ja aiottuun histopatologiseen tutkimukseen: kaikki suuret leesiot, aivot (edustavat alueet, mukaan luettuina iso-aivot, pikkuaivot ja ydin/aivosilta), selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka), aivolisäke, kilpirauhanen, lisäkilpirauhanen, kateenkorva, ruokatorvi, sylkirauhaset, maha, ohut- ja paksusuoli (mukaan lukien Peyerin imukerässikermät), maksa, haima, munuaiset, lisämunuaiset, perna, sydän, rintakehä ja keuhkot (säilötään puhaltamalla täyteen kiinnitysainetta ja upottamalla sitten siihen), aortta, sukurauhaset, kohtu, lisäsukupuolirauhaset, naaraan rintarauhanen, eturauhanen, virtsarakko, sappirakko (hiiri), imusolmukkeet (mieluiten yksi imusolmuke, joka kattaa antotien ja toinen, joka on kaukana antotiestä ja kattaa systeemiset vaikutukset), ääreishermo (lonkkahermo tai säärihermo), mieluiten lähellä kyseessä olevaa lihasta, näyte luuytimestä (ja/tai tuore luuydinnestenäyte}, nahkaa, silmät (jos oftalmologisessa tutkimuksessa havaittiin muutoksia). Kliiniset ja muut löydökset voivat antaa aihetta muiden kudosten tutkimiseen. Myös muut elimet, joihin testiaineen oletetaan vaikuttavan ennestään tunnettujen ominaisuuksien perusteella, olisi säilöttävä.

1.5.2.4 *Histopatologia*

Täydellinen histopatologinen tutkimus olisi tehtävä kontrolliryhmän ja suuren annoksen ryhmän kaikkien eläinten säilötyistä elimistä ja kudoksista. Nämä tutkimukset on tehtävä myös muiden annosryhmien eläimille, jos suuren annoksen ryhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia.

Kaikki suuret leesiot olisi tutkittava.

Jos tutkimuksessa on mukana testiryhmä, jolle testiä on jatkettu pitempään sen jälkeen, kun testiaineen antaminen lopetettiin, histopatologiset tutkimukset on tehtävä niille kudoksille ja elimille, joissa on näkynyt muutoksia käsitellyissä ryhmissä.

▼B

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Tutkimuksessa on ilmoitettava yksilökohtaiset tulokset. Tulokset on lisäksi esitettävä taulukoituina, ja niistä on käytävä ilmi seuraavat tiedot: kuhunkin ryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa: testin aikana kuolleena löydettyjen tai inhimillisistä syistä tapettujen eläinten lukumäärä ja kuoleman tai tappamisen ajankohta: niiden eläinten lukumäärä, joissa näkyy myrkkyvaikutuksia; havaittujen myrkkyvaikutusten kuvaus, mukaan luettuna myrkytysoireiden alku, kesto ja vakavuus; niiden eläinten lukumäärä, joissa havaitaan leesioita: leesioiden tyyppi ja kunkin tyypin leesioista kärsivien eläinten prosenttiosuus.

Kun on numeerisia tuloksia, ne on arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastomenetelmällä. Tilastomenetelmät ja analysoitavat määritystulokset on valittava tutkimusta suunniteltaessa.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

2.2.1 **Testiaine:**

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikokemialliset ominaisuudet,

— tunnistetiedot,

— kantaja-aine (tarvittaessa): jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

2.2.2 **Koe-eläinlajit:**

— käytetty eläinlaji ja kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— toimittaja, häkit, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

2.2.3 **Koeolosuhteet:**

— annostasojen valintaperusteet,

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta/ravintovalmisteesta, pitoisuus, stabiilisuus ja tasalaatuisuus valmisteessa.

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen antotavasta,

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk) ja muuntokerroin ravintoon/-juomaveteen sekoitetun testiaineen pitoisuudelle (ppm) tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta.

2.2.4 **Tulokset:**

— eläimen paino ja painon muutokset,

— ravinnon nauttiminen ja veden nauttiminen tarvittaessa,

— myrkyllisyysvaste sukupuolittain ja annostasoittain, mukaan lukien myrkyllisyysvaikutuksen merkit,

▼B

— kliinisten havaintojen laatu, vakavuus ja kesto (sekä palautuvat vaikutukset että muut),

— silmätutkimuksen tulokset,

— aistitoiminta, tarttumisvoimakkuus ja motorisen aktiivisuuden arviointi (jos saatavilla),

— hematologiset testit ja kyseisiä testejä koskevat perustasot,

— kliinisen biokemian testit ja kyseisiä testejä koskevat perustasot,

— eläimen paino testin lopussa, elinten painot sekä elinten ja eläinten painosuhteet,

— ruumiinavauslöydökset,

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista histopatologisista löydöksistä,

— imeytymistiedot, jos saatavilla,

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

3. **LÄHDELUETTELO**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper. D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologie Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999–1003.

(3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691–704.

(4) Moser, V. C, Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, pp. 267–283.

(5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol, 1, pp. 233–236.

(6) Crofton K. M., Howard J. L, Moser V. C, Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599–609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). ”Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies”, Fundam. & Appl. Toxicol., 29, pp. 198–201.

▼B

B.27. **SUBKROONINEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTESTI TOISTETUILLA ANNOKSILLA TEHTÄVÄ 90 VUOROKAUDEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS MUILLA KUIN JYRSIJÖILLÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti on toisinto OECD:n testiohjeesta N:o 409 (1998).

1.1 JOHDANTO

Määritettäessä ja arvioitaessa kemikaalin myrkyllisyysominaisuuksia voidaan subkrooninen toistetuilla annoksilla aiheutettu suun kautta vaikuttava myrkyllisyys määrittää sen jälkeen, kun alustavia myrkyllisyyttä koskevia tietoja on saatu välittömän myrkyllisyyden testistä tai toistetuilla annoksilla suoritetusta vuorokauden myrkyllisyystestistä. 90 vuorokauden tutkimuksesta saadaan tietoja mahdollisista terveyshaitoista, joita todennäköisesti seuraa toistuvasta altistuksesta aikana, jolloin eläin kasvaa nopeasti nuoreksi aikuiseksi. Tutkimuksessa saadaan tietoa tärkeimmistä myrkyllisyysvaikutuksista, siinä käyvät ilmi kohde-elimet ja aineen mahdollinen kertyminen ja siinä voidaan saada arvio haitattomista altistustasoista (NOAEL), joita voidaan käyttää valittaessa annoksia pitkäaikaisten vaikutusten tutkimiseen sekä turvallisuuskriteerien asettamiseen ihmisten altistukselle.

Tällä testimenetelmällä voidaan tunnistaa kemikaalialtistuksen haittavaikutukset muissa kuin jyrsijöissä, ja sitä olisi käytettävä ainoastaan silloin, kun

— muissa tutkimuksissa havaitut vaikutukset edellyttävät selvennystä tai tarkempaa ominaisuuksien määrittämistä jossain muussa lajissa, joka ei ole jyrsijä,

— oksikokineettisten tutkimusten perusteella muu kuin jyrsijä on paras koe-eläinlaji, tai

— muun kuin jyrsijän käyttö on perusteltua muista erityisistä syistä.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Annos: annetun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan painoyksikköinä (g, mg) tai testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esim. mg/kg) tai vakiopitoisuuksina ravinnossa (ppm).

Annostelu: yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutaajuuden ja annostelun keston.

NOAEL: lyhennys määritelmälle ”no observed adverse effect level” eli korkein annostaso, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta annetaan suun kautta päivittäin asteittain vaihtelevina annoksina useille koe-eläinryhmille niin, että yhtä annostasoa annetaan ryhmää kohti 90 vuorokauden ajan. Tänä aikana eläimiä havainnoidaan tarkasti myrkyllisyysvaikutusten havaitsemiseksi. Testin kuluessa kuolleille tai tapetuille eläimille tehdään ruumiinavaus, ja testin päättyessä myös vielä elossa olevat eläimet tapetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

▼B

1.4 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Eläinlajin valinta**

Jos käytetään muuta eläinlajia kuin jyrsijää, yleisesti käytetty koe-eläinlaji on koira. Koirarodun pitäisi olla tarkasti määritelty; usein käytetään beaglea. Muitakin lajeja, esim. sikaa tai minisikaa, voi käyttää. Kädellisiä ei suositella, ja niiden käytön olisi oltava perusteltua. Eläinten olisi oltava nuoria ja terveitä. Jos on kyseessä koira, annostelu olisi aloitettava mieluiten 4–6 kuukauden iässä ja viimeistään 9 kuukauden iässä. Jos tutkimuksen on tarkoitus olla alustava tutkimus pitkäaikaiselle myrkyllisyystutkimukselle, molemmissa tutkimuksissa olisi käytettävä samaa lajia/rotua.

1.4.2 **Eläinten valmistelu**

Testissä olisi käytettävä terveitä eläimiä, jotka on totutettu laboratorio-olosuhteisiin ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Totuttamisajan pituus riippuu valitusta koe-eläinlajista ja sen alkuperästä. Suositellaan vähintään viittä päivää koirille tai kyseistä tarkoitusta varten omassa siittolassa kasvatetuille sioille ja vähintään kahta viikkoa, jos eläimet ovat peräisin ulkopuoliselta toimittajalta. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja/tai ikä on tunnettava. Eläimet jaetaan satunnaistetusti kontrolli- ja käsittelyryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Kullekin eläimelle annetaan oma tunnistenumero.

1.4.3 **Annosten valmistelu**

Testiaine voidaan antaa ruokavaliossa tai juomavedessä, letkuruokinnalla tai kapseleina. Menetelmä riippuu tutkimuksen tarkoituksesta ja testiaineen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista.

Tarvittaessa testiaine liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esim. maissiöljyyn) tehtävää liuosta tai emulsiota ja sitten mahdollisesti muita liuottimia. Jos liuotin on muu kuin vesi, sen myr-kyllisyysominaisuudet on tunnettava. Testiaineen stabiilisuus annosteluolosuhteissa olisi määritettävä.

1.5 TESTIN SUORITUS

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Kullakin annostasolla olisi käytettävä vähintään kahdeksaa eläintä (neljä naarasta ja neljä koirasta). Jos eläimiä tapetaan kokeen aikana, testiin on otettava alussa sen verran enemmän eläimiä kuin niitä tapetaan ennen tutkimuksen päättymistä. Eläinten lukumäärän testin päättyessä on oltava riittävä myrkyllisyysvaikutusten järkevään arviointiin. Kemikaalista tai sitä läheisesti muistuttavasta aineesta saatavilla olevien aiempien tietojen perusteella olisi harkittava kahdeksan eläimen (neljä kumpaakin sukupuolta) lisäryhmän sisällyttämistä kontrolliryhmään ja suurimman annoksen ryhmään sitä varten, että niitä havainnoitaisiin käsittelyjakson jälkeen mahdollisten myrkyllisyysvaikutusten palautumisen tai jatkumisen havaitsemiseksi. Tämä käsittelyn jälkeinen aika olisi asetettava havaittujen vaikutusten mukaan.

▼B

1.5.2 **Annokset**

Tutkimuksessa on käytettävä vähintään kolmea annostasoa, ja testin kanssa samaan aikaan on tehtävä kontrolli, paitsi jos tehdään raja-arvotesti (ks. 1.5.3). Annostasot voidaan asettaa toistetuilla annoksilla tehdyn testin tai raja-arvotestin tulosten perusteella, ja kaikki mahdolliset testiaineesta tai samanlaisista aineista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon. Mikäli testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso olisi valittava siten, että se on myrkyllinen, mutta ei johda kuolemaan eikä aiheuta suurta kärsimystä. Annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla. Kaksin-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevassa annossarjassa, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin n. 6–10-kertaisia).

Kontrolliryhmän on oltava käsittelemätön ryhmä tai kantaja-ainetta saava ryhmä, jos testiaineen antamiseen käytetään kantaja-ainetta. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta testiainetta. Jos käytetään kantaja-ainetta, kontrolliryhmän on saatava kantaja-aine suurimmassa käytetyssä tilavuudessa. Jos testiaine annetaan ravinnon mukana ja siitä aiheutuu ravinnonoton vähenemistä, voi normaaliravintoa saava kontrolliryhmä olla hyödyllinen, jotta erotettaisiin maittavuudesta aiheutunut ravinnonoton väheneminen sellaisesta, joka aiheutuu testimallin toksikologisista muutoksista.

Seuraavat mahdollisen kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, aineenvaihduntaan tai testiaineen retentioon elimistössä; sellaiset vaikutukset testiaineen kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyllisyysominaisuuksia; sekä vaikutukset ravinnon tai veden nauttimiseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen.

1.5.3 **Raja-annostesti**

Ellei yhdellä annostasolla, joka on vähintään 1 000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) / vrk ja joka annetaan tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, havaita haittavaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Rajatestisääntöä sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

1.5.4 **Antotapa**

Eläimille annetaan testiainetta päivittäin seitsemänä päivänä viikossa 90 vuorokauden ajan. Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä, esim. testiainetta annetaan viitenä päivänä viikossa, se on perusteltava. Jos testiaine annetaan letkuruokinnalla, se on annettava yhtenä annoksena mahaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä. Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus riippuu koe-eläimen koosta. Tilavuuden pitäisi yleensä olla mahdollisimman pieni. Testitilavuuksien tilavuuden vaihtelun pitäisi olla mahdollisimman pientä (testiannos-ten pitoisuutta olisi säädeltävä niin, että tilavuus olisi sama kaikilla annostasoilla), paitsi jos käytetään ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutus suuremmissa pitoisuuksissa on yleensä voimakkaampi.

▼B

Kun testiaine annetaan ravinnon tai juomaveden kanssa, on tärkeää varmistaa, ettei testiainemäärä häiritse normaalia ravitsemusta tai vesitasetta. Kun testiaine annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa. Mahdolliset muut antotavat on mainittava. Kun aine annetaan letkulla tai kapseleina, annos olisi annettava joka päivä suunnilleen samaan aikaan, ja sitä olisi mukautettava tarvittaessa, jotta annostaso voitaisiin pitää vakiona suhteutettuna eläimen painoon. Kun 90 vuorokauden testin on tarkoitus olla alustava testi ennen pitkäaikaisen myrkyllisyystestin suorittamista, olisi molemmissa testeissä käytettävä samanlaista ruokavaliota.

1.5.5 **Havainnot**

Havainnointiajan olisi oltava vähintään 90 vuorokautta. Pitkäaikaiseen havainnointiin tarkoitetun ryhmän eläimiä olisi pidettävä sopiva aika ilman käsittelyä, jotta voitaisiin osoittaa myrkyllisyysvaikutusten pysyvyys tai eläinten toipuminen niistä.

Yleiset kliiniset havainnot olisi tehtävä vähintään kerran päivässä, mieluiten samaan kellonaikaan (samoihin kellonaikoihin). Tässä olisi otettava huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Eläinten kliininen tila on kirjattava. Kaikki eläimet tarkastetaan sairastavuuden ja kuolleisuuden havaitsemiseksi vähintään kahdesti päivässä, tavallisesti aamulla ja illalla.

Kaikista eläimistä olisi tehtävä yksityiskohtaiset kliiniset havainnot vähintään kerran ennen ensimmäistä altistusta (jotta eläimessä havaittavia muutoksia voidaan verrata lähtötilaan) ja kerran viikossa sen jälkeen. Havainnointi olisi tehtävä niin, että eläin on häkin ulkopuolella, mieluiten vakioalueella ja suunnilleen samaan vuorokaudenaikaan. Olisi pyrittävä siihen, että havainnointiolosuhteissa olisi mahdollisimman vähän vaihtelua. Myrkyllisyyden merkit olisi kirjattava huolellisesti, mukaan luettuna niiden alkamisajankohta, aste ja kesto. Kirjattavia havaintoja olisivat mm. muutokset nahassa, turkissa, silmissä ja limakalvoissa, eritykset ja eritteet, autonominen aktiviteetti (esim. kyynelet, karvojen jäykistyminen, silmäterän koko, epätavallinen hengitys). Muutokset käynnissä, asennossa ja reagoimisessa käsittelyyn sekä kouristusliikkeet ja jäykkyys, kaavamaiset liikkeet (esim. liioiteltu siistiminen, toistuva ympyrää kulkeminen) tai omituinen käyttäytyminen olisi myös kirjattava (1).

Silmät olisi tutkittava oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testiaineen antamista ja testin lopussa mieluiten kaikilta koeeläimiltä ja ainakin suuren annoksen ryhmään ja kontrolliryhmään kuuluvilta. Jos silmissä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, olisi tutkittava kaikki eläimet.

1.5.5.1 *Eläimen paino ja ravinnon ja/lai veden nauttiminen*

Kaikki eläimet olisi punnittava vähintään kerran viikossa. Ravinnonotto olisi mitattava vähintään viikoittain. Jos testiaine annetaan juomaveden mukana, veden nauttiminen olisi myös mitattava vähintään viikoittain. Veden nauttimisen mittaamista voidaan harkita myös sellaisissa ruoka- tai letkuruokintatutkimuksissa, joiden aikana juomisessa voi esiintyä muutoksia.

▼B

1.5.5.2 *Hematologia ja kliininen biokemia*

Verinäytteet olisi otettava nimetystä paikasta ja säilytettävä tarvittaessa asianmukaisissa olosuhteissa. Testiajanjakson lopussa näytteet otetaan juuri ennen tappamista tai sen yhteydessä.

Verestä olisi tehtävä tutkimuksen alussa ja sitten joko kuukauden välein tai testiajanjakson puolivälissä ja lopuksi testiajanjakson päättyessä seuraavat määritykset: hematokriitti, hemoglobiinikonsentraatio, punasolujen määrä, valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erittelylaskenta, verihiutaleiden määrä ja veren hyytymiskykyä kuvaavia määrityksiä, kuten hyytymisaika, protrombiiniaika tai tromboplastiiniaika.

Kliinisen biokemian määritykset, joilla tutkitaan tärkeimpiä myrkyllisyysvaikutuksia kudoksissa ja erityisesti munuaisissa ja maksassa, olisi tehtävä verinäytteistä, jotka on otettu kaikista eläimistä tutkimuksen alussa ja sitten joko kuukauden välein tai testiajanjakson puolivälissä ja lopuksi testiajanjakson päättyessä. Testattavaksi harkittavia kohteita ovat elektrolyyttitasapaino, hiilihydraattiaineenvaihdunta sekä maksan ja munuaisten toiminta. Erityistestien valinta riippuu testiaineen vaikutustavasta tehdyistä havainnoista. Eläimiä olisi pidettävä paastossa sopiva aika ennen verinäytteiden ottamista. Suositeltavia määrityksiä ovat mm. kalsium, fosfori, kloridi, natrium, kalium, paastoglukoosi, alaniiniaminotransferaasi, asparagiinihappoaminotransferaasi, omitiinidekarboksylaasi, gamma-glutamiinihappotranspeptidaasi, urcatyppi, albumiini, veren kreatiniini, kokonaisbilirubiini ja seerumin kokonaisproteiinipitoisuus.

Virtsamäärityksiä olisi tehtävä ainakin tutkimuksen alussa, sitten tutkimuksen puolivälissä ja lopuksi sen päättyessä (virtsan keruuaika on mitattava). Virtsasta on määritettävä ulkonäkö, tilavuus, osmolaalisuus tai ominaistiheys, pH, valkuainen, glukoosi ja veri ja/tai verisolut. Muita muuttujia voidaan mitata tarvittaessa.

Lisäksi olisi harkittava yleistä kudosvauriota osoittavien merkkiaineiden määritystä. Muita myrkyllisyyden arviointiin mahdollisesti tarvittavia määrityksiä ovat esim. lipidi-, hormoni-, happo/emäs-, methemoglobiini- ja koliiniesteraasi-inhibiittorimääritykset. Muita kliinisen biokemian määrityksiä voidaan tehdä tarvittaessa havaittujen vaikutusten tutkimisen laajentamiseksi. Tarvittavat määritykset olisi yksilöitävä tiettyihin luokkiin kuuluville kemikaaleille tai tapauskohtaisesti.

Kaiken kaikkiaan lähestymistavan on oltava joustava. Se riippuu eläinlajista ja aineen havaitusta ja/tai odotetusta vaikutuksesta.

1.5.5.3 *Ruumiinavaustutkimukset*

Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Kaikkien eläinten (lukuun ottamatta kuolleina löydettyjä ja/tai kesken koetta tapettuja) maksa ja sappirakko, munuaiset, lisämunuaiset, kivekset, lisäkivekset, munasarjat, kohtu, kilpirauhanen (ja lisäkilpirauhaset), kateenkorva. perna, aivot ja sydän olisi puhdistettava muusta kudoksesta tapauksen mukaan, ja ne olisi punnittava mahdollisimman nopeasti avauksen jälkeen kuivumisen estämiseksi.

▼B

Seuraavat kudokset olisi säilöttävä sellaiseen kiinnitysväliaineeseen, joka sopii parhaiten kyseiselle kudostyypille ja aiottuun histopatologiseen tutkimukseen: kaikki suuret leesiot, aivot (edustavat alueet, mukaan luettuina isoaivot, pikkuaivot ja ydin/aivosilta), selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka), aivolisäke, kilpirauhanen, lisäkilpirauhanen, kateenkorva, ruokatorvi, sylkirauhaset, maha, ohut- ja paksusuoli (mukaan luettuna Peyerin imukerässikermät), maksa, sappirakko, haima, munuaiset, lisämunuaiset, perna, sydän, rintakehä ja keuhkot, aortta, sukurauhaset, kohtu, lisäsukupuolirauhaset, naaraan rintarauhanen, eturauhanen, virtsarakko, imusolmukkeet (mieluiten yksi imusolmuke, joka kattaa antotien ja toinen, joka on kaukana autotiestä ja kattaa systeemiset vaikutukset), ääreishermo (lonkkahermo tai säärihermo), mieluiten lähellä kyseessä olevaa lihasta, näyte luuytimestä (ja/tai tuore luuydinnestenäyte) ja nahkaa. Kliiniset ja muut löydökset voivat antaa aihetta muiden kudosten tutkimiseen. Myös muut elimet, joihin testiaineen oletetaan vaikuttavan ennestään tunnettujen ominaisuuksien perusteella, olisi säilöttävä.

1.5.5.4 *Histopatologia*

Täydellinen histopatologinen tutkimus olisi tehtävä kontrolliryhmän ja suuren annoksen ryhmän kaikkien eläinten säilötyistä elimistä ja kudoksista. Nämä tutkimukset on tehtävä myös muiden annosryhmien eläimille, jos suuren annoksen tyhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia.

Kaikki suuret leesiot olisi tutkittava.

Jos tutkimuksessa on mukana testiryhmä, jolle testiä on jatkettu pitempään sen jälkeen, kun testiaineen antaminen lopetettiin, histopatologiset tutkimukset on tehtävä niille kudoksille ja elimille, joissa on näkynyt muutoksia käsitellyissä ryhmissä.

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Tutkimuksessa on ilmoitettava yksilökohtaiset tulokset. Tulokset on lisäksi esitettävä taulukoituina, ja niistä on käytävä ilmi seuraavat tiedot: kuhunkin ryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa; testin aikana kuolleena löydettyjen tai inhimillisistä syistä tapettujen eläinten lukumäärä ja kuoleman tai tappamisen ajankohta; niiden eläinten lukumäärä, joissa näkyy myrkkyvaikutuksia; havaittujen myrkkyvaikutusten kuvaus, mukaan luettuina myrkytysoireiden alku, kesto ja vakavuus; niiden eläinten lukumäärä, joissa havaitaan leesioita; leesioiden tyyppi ja kunkin tyypin leesioista kärsivien eläinten prosenttiosuus.

Kun on numeerisia tuloksia, ne on arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastomenetelmällä. Tilastomenetelmät ja analysoitavat määritystulokset on valittava tutkimusta suunniteltaessa.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

▼B

2.2.1 **Testiaine:**

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikokemialliset ominaisuudet,

— tunnistetiedot,

— kantaja-aine (tarvittaessa): jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

2.2.2 **Koe-eläinlajit:**

— käytetty eläinlaji ja kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— toimittaja, häkit, ravinto jne.,

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

2.2.3 **Koeolosuhteet:**

— annostasojen valintaperusteet,

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta/ravintovalmisteesta, pitoisuus, stabiilisuus ja tasalaatuisuus valmisteessa,

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen antotavasta,

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk) ja muuntokerroin ravintoon/-juomaveteen sekoitetun testiaineen pitoisuudelle (ppm) tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta.

2.2.4 **Tulokset:**

— eläimen paino ja painon muutokset,

— ravinnon nauttiminen ja veden nauttiminen tarvittaessa,

— myrkkyvaste sukupuolittain ja annostasoittain, mukaan luettuina myrkkyvaikutuksen merkit,

— kliinisten havaintojen laatu, vakavuus ja kesto (sekä palautuvat vaikutukset että muut),

— silmätutkimukset,

— hematologiset testit ja kyseisiä testejä koskevat perustasot,

— kliinisen biokemian testit ja kyseisiä testejä koskevat perustasot,

— eläimen paino testin lopussa, elinten painot sekä elinten ja eläinten painosuhteet,

— ruumiinavauslöydökset,

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista histopatologisista löydöksistä,

— imeytymistiedot, jos saatavilla,

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

▼B

B.28. **SUBKROONINEN MYRKYLLISYYSTESTI (IHON KAUTTA) TOISTUVA ANNOSTELU IHON KAUTTA, 90 VUOROKAUTTA, JYRSIJÄT**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Testattavaa ainetta annostellaan päivittäin 90 vuorokauden ajan useisiin ryhmiin jaettujen koe-eläinten iholle eri pitoisuuksina, yksi pitoisuus kullekin ryhmälle. Tutkimuksen kuluessa eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkkyoireiden toteamiseksi. Kokeen aikana kuolleille eläimille ja sen loputtua elossa oleville eläimille suoritetaan ruumiinavaus.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

Eläimet siirretään koetiloihin ja testin aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen testin alkua. Nuoret, terveet eläimet jaetaan satunnaisesti koe- ja kontrolliryhmiin. Juuri ennen kokeen alkua eläinten selästä poistetaan karvapeite leikkaamalla. Karvapeite voidaan myös ajella, mutta se tulee tehdä noin vuorokautta ennen testin alkua. Karvanpoisto on yleensä toistettava noin viikon välein. Karvapeitettä poistettaessa on varottava vahingoittamasta ihoa. Vähintään 10 % ruumiin pinnasta on oltava ajeltuna, jotta siihen voidaan annostellaan testattavaa ainetta. Koealueen suuruus ja peitesiteen mitat riippuvat eläimen painosta. Kun testataan kiinteitä aineita, jotka voidaan tarvittaessa jauhaa, aine kostutetaan vedellä tai sopivalla liuottimella, jotta ihoon saadaan hyvä kosketus. Testattavia nesteitä ei yleensä laimenneta. Päivittäinen altistus tehdään 5–7 kertaa viikossa.

Koeolosuhteet

K o e - e l ä i m e t

Voidaan käyttää täysikasvuisia rottia, kaneja tai marsuja. Muitakin lajeja voidaan käyttää, mutta niiden käyttö on perusteltava. Tutkimuksen alkaessa koe-eläinten paino saa vaihdella korkeintaan ± 20 % keskiarvosta. Mikäli pitkäaikaistutkimuksen esitestinä on tehty subkrooninen ihon kautta tapahtuva altistustesti, kummassakin kokeessa on käytettävä samaa lajia ja kantaa.

▼B

Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin annostasoa varten tarvitaan vähintään 20 terveihoista eläintä (10 naarasta ja 10 urosta). Naaraiden on oltava synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla tiineenä. Mikäli tutkimussuunnitelma edellyttää eläinten lopettamista tutkimuksen kuluessa, eläinmäärään on lisättävä lopettaviksi aiottujen eläinten määrä. Lisäksi voidaan muodostaa 20 eläimen satelliittiryhmä (10 eläintä kumpaakin sukupuolta), jolle annetaan suurin annos 90 vuorokauden aikana ja jota tarkkaillaan 28 päivän ajan kokeen loputtua myrkytysoireiden ohimenevyyden, pysyvyyden tai viivästyneen esiintymisen toteamiseksi.

Annostasot

Testissä käytetään vähintään kolmea annostasoa ja kontrolliryhmää tai liuotinkontrolliryhmää, jos liuotinta käytetään. Päivittäinen altistusaika on vähintään kuusi tuntia. Eläimet altistetaan testattavalle aineelle samaan aikaan joka päivä ja annosta säädetään määräajoin (viikoittain tai joka toinen viikko), jotta annostaso pysyy muuttumattomana suhteessa eläimen painoon. Kontrolliryhmän eläimille ei anneta testattavaa ainetta, mutta muuten niitä käsitellään aivan samoin kuin testiryhmän eläimiä. Mikäli liuotinta käytetään annostelun helpottamiseksi, kontrolleille annostellaan liuotinta samalla tavoin kuin testiryhmille ja liuottimen määrä on yhtä suuri kuin suurimman annostason saavan testiryhmän liuotinmäärä. Suurimman annoksen tulisi aiheuttaa myrkytysoireita, mutta ei lainkaan tai hyvin vähän kuolemantapauksia. Pienimmällä annoksella ei saisi olla myrkkyvaikutusta. Mikäli ihmisten altistustasosta on tietoja, pienimmän testiannoksen on oltava tätä suurempi. Keskimmäisen annostason olisi aiheutettava pienimmät havaittavissa olevat myrkytysoireet. Käytettäessä useampia väliannostasoja ne on porrastettava niin, että myrkytysoireet lisääntyvät asteittain. Pienimmän ja keskisuuren annoksen saavissa ryhmissä sekä kontrolliryhmässä kuolemantapausten luvun on oltava pieni, jotta tuloksista voidaan tehdä luotettava arviointi.

Mikäli testattava aine aiheuttaa voimakasta ihon ärsytystä, aineen pitoisuutta pienennetään ja tämä voi aiheuttaa muiden myrkytysoireiden poisjäämisen tai vähenemisen korkeimmalla annostasolla. Jos iho on pahoin vaurioitunut, voi olla tarpeen lopettaa tutkimus ja aloittaa uusi pienemmillä pitoisuuksilla.

Raja-annostesti

Jos esitutkimuksessa ei esiinny testattavaan aineeseen liittyviä myrkkyvaikututuksia 1 000 mg/kg:n tai sitä suuremmalla, ihmisten altistumisen perusteella määritetyllä annostasolla, jatkotestejä ei yleensä tarvitse tehdä.

Tarkkailuaika

Eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkytysoireiden toteamiseksi. Kuolinaika sekä myrkytysoireiden alkamis- ja loppumisaika kirjataan.

▼B

Testin suorittaminen

Eläimet säilytetään yksittäishäkeissä. Niitä käsitellään testattavalla aineella mieluimmin viikon jokaisena päivänä 90 vuorokauden ajan.

Mikäli tutkimukseen sisältyy satelliittiryhmä, sitä tarkkaillaan vielä 28 päivän ajan altistamisen loputtua myrkkyvaikutusten ohimenevyyden tai pysyvyyden toteamiseksi. Altistamisajan on oltava kuusi tuntia päivässä.

Testattavaa ainetta annostellaan tasaisesti alueelle, joka on n. 10 % ruumiin koko pinta-alasta. Testattaessa erittäin myrkyllisiä aineita altistusalue voi olla pienempi, mutta aine tulisi levittää alueelle mahdollisimman ohuena ja tasaisena kalvona.

Testattava aine pidetään kosketuksessa ihoon huokoisen sideharson ja ärsyttämättömän teipin avulla. Testialueelle on asetettava jokin sopiva peite pitämään harsosidos ja testattava aine paikoillaan ja estämään eläintä syömästä sitä. Eläimen liikkumista voidaan rajoittaa, mutta täydellisesti liikkumattomaksi saattaminen ei ole suositeltava menettelytapa.

Altistusajan päätyttyä jäljellä oleva aine poistetaan vedellä tai puhdistamalla iho jollakin muulla sopivalla tavalla.

Eläimiä tarkkaillaan päivittäin ja myrkytysoireet, niiden alkamis- ja kestoaika sekä voimakkuus kirjataan. Eläimiä tarkkailtaessa kiinnitetään huomiota muutoksiin, joita tapahtuu karvapeitteessä ja ihossa, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa ja käyttäytymistavassa. Ruoan kulutus mitataan ja eläimet punnitaan viikoittain. Tarkkailua on suoritettava säännöllisesti, jotta koe-eläimiä ei menetettäisi kannibalismin, kudosten autolyysin tai virheellisen sijoituksen vuoksi. Tutkimuksen päätyttyä eloonjääneille eläimille satelliittiryhmää lukuun ottamatta suoritetaan ruumiinavaus. Kuolemaisillaan olevat eläimet poistetaan viipymättä ja niille suoritetaan ruumiinavaus.

Seuraavat tutkimukset tehdään testin päätyttyä kaikille eläimille, mukaan lukien kontrolliryhmän eläimet:

a) Silmätutkimus on suoritettava oftalmoskoopilla tai vastaavalla laitteella ennen aineen antamista ja testin päätyttyä mieluimmin kaikille eläimille, mutta vähintään suurimman annoksen saaneille sekä kontrolliryhmälle. Mikäli silmissä havaitaan muutoksia, kaikki eläimet tutkitaan.

b) Veritutkimus, jossa määritetään hematokriitti, hemoglobiini, erytrosyyttien määrä, leukosyyttien määrä ja erittely sekä joitakin hyytymisominaisuuksia kuten hyytymisaika, protrombiiniaika, tromboplastiiniaika tai trombosyyttien määrä, tehdään tutkimusajanjakson päätyttyä.

▼B

c) Veren kliininen biokemiallinen tutkimus on suoritettava tutkimusajanjakson päätyttyä. Kaikkiin tutkimuksiin soveltuvia määrityskohteita ovat elektrolyyttitasapaino, hiilihydraattien metabolia sekä, maksan ja munuaisten toiminta. Testien valintaperusteena on aineen todettu vaikutustapa. Suositeltavia määrityskohteita ovat: kalsium, fosfori, kloridi, natrium, kalium, glukoosin paastoarvo (lajille soveltuva paaston pituus), seerumin glutamiinipyruviinitransaminaasi ([1]), seerumin glutamiinioksaloasetaattitransaminaasi ([2]), ornitiinidekarboksylaasi, gammaglutamyylitranspeptidaasi, virtsan typpi, albumiini, veren kreatiniinin kokonaisbilirubiini ja seerumin proteiinit. Myrkyllisyyden arvioinnissa auttavat tarvittaessa lisävalaistusta esimerkiksi lipidi-, hormoni-, happo/emästasapaino-, methemoglobiini- ja kolinesteraasiaktiivisuuden analyysit. Muitakin kliinisiä biokemiallisia testejä voidaan tehdä, jos todettujen vaikutusten laajempi tutkimus on tarpeen.

d) Virtsa-analyysia ei yleensä tarvita. Se tehdään silloin, kun oletettu tai todettu myrkyllisyys antaa siihen aihetta.

Mikäli käytettävissä olevat taustatiedot ovat riittämättömät, hematologisten ja biokemiallisten parametrien määritystä tulisi harkita ennen altistuksen aloittamista.

Ruumiinavaus

Kaikille koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus, jossa tutkitaan ruumis ulkopuolelta, kaikki aukot, kallo-, rinta- ja vatsaontelo sekä niiden sisältö. Maksa, munuaiset, lisämunuaiset ja kivekset punnitaan märkinä mahdollisimman pian irrottamisen jälkeen, jotta ne eivät pääse kuivumaan. Seuraavat elimet ja kudokset säilytetään sopivassa aineessa mahdollista myöhempää histopatologista tutkimusta varten: kaikki näkyvät vammat, aivot — ytimen/aivosillan osat mukaan lukien, pikkuaivokuori ja aivokuori, aivolisäke, kilpirauhanen/-lisäkilpirauhanen, kateenkorvakudosta, (henkitorvi), keuhkot, sydän, aortta, sylkirauhaset, maksa, perna, munuaiset, lisämunuaiset, haima, sukupuolirauhaset, kohtu, muut sukupuolielimet, sappirakko (jos on), ruokatorvi, mahalaukku, pohjukaissuoli, ohutsuoli, umpisuoli, paksusuoli, peräsuoli, virtsarakko, tyypillinen imusolmuke (naarailta rintarauhanen), (reisilihaksistoa), ääreishermo, (silmät), (rintalasta luuytimineen), (reisiluu ja nivelen pintaa) (selkärankaa kolmesta kohdasta — kaulasta, henkitorven keskiosasta ja lantiosta) sekä (kyynelrauhaset). Suluissa olevat kudokset tutkitaan vain, jos ne tai kohde-elimet osoittavat merkkejä myrkyllisyydestä.

Histopatologinen tutkimus

a) Suurimman annoksen saaneen ryhmän sekä kontrolliryhmän eläinten normaalista ja altistetusta ihosta otetuille näytteille sekä elin- ja kudosnäytteille tehdään täydellinen histopatologinen tutkimus.

b) Kaikki näkyvät vammat tutkitaan.

([1]) Nykyisin seerumin alaniiniaminotransferaasi.
([2]) Nykyisin seerumin aspartaattiaminotransferaasi.

▼B

c) Muiden annosryhmien eläinten tärkeät elimet tutkitaan.

d) Rotan ollessa koe-eläimenä tutkitaan alhaisen ja keskitason annosryhmien eläinten keuhkot infektioiden löytämiseksi, koska niiden perusteella pystytään vaivattomasti arvioimaan eläinten terveydentila. Yleensä ei näiden ryhmien eläimille tarvitse suorittaa muita histopatologisia tutkimuksia, mutta elimet, jotka suurimman annoksen saaneessa ryhmässä olivat vaurioituneet, on aina tutkittava myös näiden ryhmien osalta.

e) Kun tutkimukseen sisältyy satelliittiryhmä, histopatologinen tutkimus suoritetaan niille elimille ja kudoksille, joissa muiden ryhmien eläimillä oli vaurioita.

2. **TULOKSET**

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta näkyy kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä kokeen alussa, vammautuneiden eläinten määrä ja eläinten prosentuaalinen osuus kutakin erityyppistä vammaa kohden. Tulosten merkitsevyys arvioidaan jotakin tilastollista menetelmää käyttäen. Kaikkia tunnettuja tilastointimenetelmiä voidaan käyttää.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— eläinlaji, kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ruokavalio,

— koeolosuhteet,

— annostasot (käytetty liuotin) ja pitoisuudet,

— myrkyllisyysoireet sukupuolen ja annostason perusteella,

— oireeton taso, mikäli mahdollista,

— eläinten kuolinaika tutkimuksen kuluessa ja eloonjääneet sen päätyttyä,

— selostus myrkyllisyysoireista ja muista vaikutuksista,

— kunkin oireen toteamisaika ja kehittyminen,

— ruokintaa ja painoa koskevat tiedot,

— silmälöydökset,

— veritestit ja kaikki tulokset,

— kliiniset biokemialliset testit ja kaikki tulokset (myös virtsa-analyysitulokset),

— ruumiinavauslöydökset,

▼B

— tarkka selostus kaikista histopatologisista löydöksistä,

— tulosten tilastointitapa, mikäli mahdollista,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼M4

B.29 **SUBKROONINEN MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ: 90 PÄIVÄN TUTKIMUS**

TIIVISTELMÄ

Tämän tarkistetun testimenetelmän B.29 tarkoituksena on luonnehtia kokonaisvaltaisesti testikemikaalin myrkyllisyyttä hengitettynä toistuvan altistuksen jälkeen tietyllä ajanjaksolla (90 päivää) ja tuottaa yksityiskohtaista tietoa määrällistä riskinarviointia varten. Jyrsijäryhmät, joissa on vähintään kymmenen urosta ja kymmenen naarasta, altistetaan kuuden tunnin ajan päivittäin 90 päivän (13 viikon) ajan a) testikemikaalille kolmella tai useammalla pitoisuudella, b) suodatetulle ilmalle (negatiivinen kontrolli) ja/tai kantaja-aineelle (kantaja-ainekontrolli). Eläimiä altistetaan yleensä viitenä päivänä viikossa, mutta myös seitsemän päivän altistus viikossa on mahdollista. Sekä uroksia että naaraita testataan aina, mutta ne voidaan altistaa eri pitoisuuksille, jos jommankumman tiedetään olevan herkempi tietylle testikemikaalille. Tässä menetelmässä tutkimuksen johtajalla on mahdollisuus sisällyttää tutkimukseen satelliittiryhmiä (vaikutusten korjaantuvuus), eläinten lopettamista tutkimuksen aikana, bronkoalveolaarinen huuhtelu (BAL), neurologisia testejä sekä muita kliinis-kemiallisia ja histopatologisia arviointeja, jotta testikemikaalin myrkyllisyyttä voidaan luonnehtia paremmin.

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta TG 413 (2009). Alkuperäinen subkroonista inhalaatiotestiä koskeva testiohje nro 413 (TG 413) hyväksyttiin vuonna 1981. Tätä testimenetelmää B.29 (joka vastaa tarkistettua ohjetta TG 413 (2009)) on ajantasaistettu, jotta tieteellinen kehitys voidaan ottaa huomioon ja jotta nykyiset ja tulevat sääntelyvaatimukset voidaan täyttää.

2. Subkroonisia tutkimuksia, joissa tarkastellaan aineen myrkyllisyyttä hengitettynä, käytetään pääasiassa lakisääteisten pitoisuuksien johtamiseen, jotta on mahdollista arvioida työntekijälle työssä aiheutuva riski. Tutkimuksia käytetään myös ihmisten asumiseen, kuljetukseen ja ympäristöön liittyvän riskin arvioinnissa. Tämän menetelmän avulla voidaan luonnehtia haittavaikutuksia, joita seuraa toistuvasta altistumisesta testikemikaalille päivittäin hengityksen kautta 90 päivän ajan (noin 10 prosenttia rotan elinajasta). Subkroonisia hengitysmyrkyllisyyttä tarkastelevia tutkimuksia voidaan käyttää myös määrällisissä riskinarvioinneissa ja kroonisten tutkimusten pitoisuuksien valinnassa. Tätä testimenetelmää ei ole varsinaisesti tarkoitettu nanomateriaalien testaamiseen. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät ovat tämän luvun lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

ALUSTAVAT HUOMIOT

3. Testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista tutkimuksen laadun parantamiseksi ja eläinten käytön minimoimiseksi. Tietoihin, joista voi olla apua asianmukaisten testipitoisuuksien valinnassa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -toksisuustestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (odotettavissa olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista sekä muista toistuvaa altistusta käsitelleistä tutkimuksista saadut tiedot. Jos oletetaan tai havaitaan, että tutkimuksen aikana ilmenee neurotoksisuutta, tutkimuksen johtaja voi sisällyttää tutkimukseen asianmukaisia arviointeja, kuten toiminnallisen havaintosarjan (FOB:n) ja motorisen aktiivisuuden mittauksen. Vaikka altistuksen ajoitus voi olla kriittinen tietyissä tutkimuksissa, näiden ylimääräisten toimien toteuttaminen ei saa häiritä perustutkimuksen rakennetta.

▼M4

4. Syövyttävien tai ärsyttävien testikemikaalien laimennoksia voidaan testata sellaisina pitoisuuksina, joilla saadaan aikaan haluttu myrkyllisyyden aste. Katso lisätietoja ohjeasiakirjasta GD 39 (2). Kun eläimiä altistetaan näille materiaaleille, tavoitepitoisuuksien on oltava riittävän pienet, jotta eläimille ei aiheudu suurta kipua ja stressiä, mutta kuitenkin tarpeeksi suuret, jotta pitoisuus-vastekäyrä on riittävä sääntelyyn liittyvien ja tieteellisten testaustavoitteiden saavuttamiseksi. Nämä pitoisuudet on valittava tapauskohtaisesti, ja niiden tulee ensisijaisesti perustua asianmukaisesti suunniteltuun annosalueen määritystestiin, josta saadaan tietoa kriittisestä tutkittavasta ominaisuudesta, ärsytysrajasta ja oireiden alkamisajankohdasta (katso 11–13 kohta). Pitoisuuden valinnalle on esitettävä perusteet.

5. Kuolemaisillaan olevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti. Kuolemaisillaan olevia eläimiä käsitellään samalla tavalla kuin eläimiä, jotka kuolevat testissä. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (3) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

6. Kokeessa tulee käyttää terveitä nuoria täysikasvuisia jyrsijöitä, jotka kuuluvat yleisesti käytettyihin koe-eläinkantoihin. Suositeltavin laji on rotta. Jos käytetään muita lajeja, sille on esitettävä perustelut.

Eläinten valmistelu

7. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Satunnaistamispäivänä eläinten on oltava nuoria ja täysikasvuisia, ja niiden iän on oltava 7–9 viikkoa. Ruumiinpainon on oltava ± 20 prosenttia keskimääräisestä painosta kummankin sukupuolen osalta. Eläimet valitaan satunnaistetusti ja merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan. Eläimet pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin.

Eläinten hoito

8. Eläimet on voitava erottaa toisistaan esimerkiksi ihon alle asennettavien lähettimien avulla havainnoinnin helpottamiseksi ja sekaannuksien välttämiseksi. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suhteellinen ilmankosteus on pidettävä mielellään 30–70 prosentin välillä, mikä ei välttämättä ole mahdollista, jos kantaja-aineena käytetään vettä. Ennen altistuksia ja niiden jälkeen eläimet on eroteltava häkkeihin sukupuolen ja pitoisuuden mukaisiin ryhmiin, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia, ja määrä on pidettävä sellaisena, että kannibalismista ja tappelusta johtuvat hävikit voidaan minimoida. Jos eläimet altistetaan vain nasaalisesti, ne voi olla tarpeen totuttaa immobilisointiputkiin. Immobilisointiputket eivät saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta fyysistä, lämpöön tai liikkumattomuuteen liittyvää stressiä. Immobilisointi voi vaikuttaa fysiologisiin tutkittaviin ominaisuuksiin, kuten ruumiinlämpöön (hypertermia) ja/tai hengityksen minuuttitilavuuteen. Jos saatavilla on rinnakkaistietoja, jotka osoittavat, ettei tällaisia muutoksia juuri ilmene, immobilisointiputkiin totuttaminen ei ole tarpeen. Eläimet, jotka altistetaan aerosolille kokonaan, on laitettava kokeen ajaksi häkkiin yksittäin, jotta testattava aerosoli ei suodatu muiden häkissä olevien eläinten karvapeitteen kautta. Tavallista ja sertifioitua laboratorioruokavaliota voidaan käyttää muulloin paitsi altistuksen aikana, eikä tavallisen juomaveden määrää tule rajoittaa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää).

▼M4

Inhalaatiokammiot

9. Testikemikaalin luonne ja testin tavoite on otettava huomioon inhalaatiokammiota valittaessa. Ensisijainen altistustapa on vain nasaalisesti (nose-only; tähän termiin kuuluvat altistustavat vain pään kautta, vain nasaalisesti tai vain nokan kautta). Vain nasaalista altistusta suositellaan yleensä tutkittaessa nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja sekä sellaisia höyryjä, jotka saattavat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Tutkimuksen tietyt tavoitteet voidaan saavuttaa paremmin käyttämällä koko kehoon kohdistuvaa altistusta, mutta se on perusteltava tutkimusraportissa. Jotta kammion ilma voidaan pitää vakaana koko kehon kammiossa, koe-eläinten viemä tila saa olla korkeintaan viisi prosenttia kammion tilavuudesta. Vain nasaalisesti -altistuksen ja koko kehoon kohdistuvan altistuksen tekniikoiden periaatteet sekä niiden erityiset hyödyt ja haitat on kuvattu ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

MYRKYLLISYYSTUTKIMUKSET

Rajapitoisuudet

10. Toisin kuin akuuteissa tutkimuksissa, subkroonisissa tutkimuksissa, joissa tarkastellaan myrkyllisyyttä hengitettynä, ei ole määritettyjä rajapitoisuuksia. Testatun enimmäispitoisuuden osalta on otettava huomioon seuraavat seikat: 1) suurin mahdollinen pitoisuus, 2) ihmisen altistustaso pahimmassa tapauksessa, 3) tarve ylläpitää riittävä hapensyöttö ja/tai 4) eläinten hyvinvointiin liittyvät seikat. Koska tietoon perustuvia rajoja ei siis ole, voidaan käyttää asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (13) mukaisia akuutteja rajoja (ts. enimmäispitoisuus aerosolien osalta on 5 mg/l, höyryjen osalta 20 mg/l ja kaasujen osalta 20 000 ppm), ks. GD 39 (2). Jos nämä rajat täytyy ylittää esimerkiksi testattaessa kaasuja tai erittäin haihtuvia testikemikaaleja (esimerkiksi jäähdytysaineita), sille on esitettävä perustelut. Rajapitoisuudella on saatava aikaan selvä myrkyllisyys, joka ei saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta stressiä tai vaikuttaa niiden pitkäikäisyyteen (3).

Annosalueen määritystutkimus

11. Ennen päätutkimuksen aloittamista on yleensä tarpeen tehdä annosalueen määritystutkimus. Annosalueen määritystutkimus on esikoetta kattavampi, koska sitä ei ole rajattu pitoisuuden valintaan. Annosalueen määritystutkimuksesta karttunut tieto voi edistää päätutkimuksen onnistumista. Annosalueen määritystutkimuksesta voidaan saada esimerkiksi teknistä tietoa analyysimenetelmistä, hiukkasten koosta, toksisten mekanismien löytämisestä, kliinisestä patologiasta ja histopatologiasta, ja sen avulla voidaan arvioida, mitkä ovat päätutkimuksen NOAEL- ja MTC-pitoisuudet. Tutkimuksen johtaja voi päättää toteuttaa annosalueen määritystutkimuksen, jotta tiedetään, mikä on hengityselimistöä ärsyttävä pitoisuus (esimerkiksi hengityselimistön histopatologia, keuhkojen toiminnan testaus tai bronkoalveolaarinen huuhtelu), mikä on siedettävän pitoisuuden yläraja, joka ei aiheuta eläimille tarpeetonta stressiä, ja millä parametreilla testikemikaalin myrkyllisyyttä voidaan luonnehtia parhaiten.

12. Annosalueen määritystutkimuksessa voi olla yksi tai useampi pitoisuustaso. Valittujen tutkittavien ominaisuuksien mukaan kullekin pitoisuustasolle on altistettava 3–6 urosta ja 3–6 naarasta. Annosalueen määritystutkimuksen on kestettävä vähintään viisi päivää, yleensä ei enempää kuin 28 päivää. Tutkimusraportissa on esitettävä perustelut päätutkimuksen pitoisuuksien valinnalle. Päätutkimuksen tavoite on osoittaa sellainen pitoisuus-vastesuhde, joka perustuu herkimmäksi oletettuun tutkittavaan ominaisuuteen. Pienen pitoisuuden on mielellään oltava sellainen, joka ei aiheuta havaittavia haittavaikutuksia, kun taas suuren pitoisuuden on aiheutettava selvä myrkyllisyys, joka ei kuitenkaan saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta stressiä tai vaikuttaa niiden pitkäikäisyyteen (3).

▼M4

13. Kun valitaan annosalueen määritystutkimuksen pitoisuustasoja, on käytettävä kaikkea saatavilla olevaa tietoa, myös rakenne-aktiivisuussuhdetta koskevia tietoja ja samanlaisia kemikaaleja koskevia tietoja (katso 3 kohta). Annosalueen määritystutkimuksessa voidaan vahvistaa tai kumota se, mitä pidetään herkimpänä mekanistisesti perusteltuna päätepisteenä, esimerkiksi koliiniesteraasin esto organofosfaateilla, methemoglobiinin muodostus erytrosytotoksisilla aineilla, kilpirauhashormonit (T_3, T_4) kilpirauhaselle myrkyllisillä aineilla sekä proteiini, LDH tai neutrofiilit bronkoalveolaarisessa huuhtelussa vaarattomilla huonosti liukenevilla hiukkasilla tai keuhkoja ärsyttävillä aerosoleilla.

Päätutkimus

14. Subkroonista myrkyllisyyttä koskeva päätutkimus sisältää yleensä kolme pitoisuustasoa ja tarvittaessa myös samanaikaiset negatiivisen (ilma)verrokin ja/tai kantaja-aineverrokin (katso 18 kohta). Asianmukaisten altistustasojen valinnassa on käytettävä apuna kaikkia saatavilla olevia tietoja, mukaan luettuina tulokset systeemisistä myrkyllisyystutkimuksista sekä metabolia ja kinetiikka (erityisesti on pyrittävä välttämään suuria pitoisuuksia, joiden vuoksi kineettiset prosessit saturoituvat). Jokainen testiryhmä sisältää 10 urosjyrsijää ja 10 naarasjyrsijää, jotka altistetaan testikemikaalille kuuden tunnin ajaksi päivittäin viitenä päivänä viikossa 13 viikon ajanjaksolla (tutkimuksen kokonaiskesto on vähintään 90 päivää). Eläimet voidaan altistaa myös seitsemänä päivänä viikossa (esimerkiksi testattaessa inhaloitavia lääkkeitä). Jos jommankumman sukupuolen tiedetään olevan herkempi tietylle testikemikaalille, sukupuolet voidaan altistaa eri pitoisuuksille pitoisuus-vasteen optimoimiseksi 15 kohdassa kuvatun mukaisesti. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoja voidaan mukauttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Perustelut on esitettävä, jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä tai jos on toteutettava pitkäkestoinen (esimerkiksi 22 tuntia/päivä) koko kehoon kohdistuvan altistuksen tutkimus (katso GD 39) (2). Eläimiä ei saa ruokkia altistusjakson aikana, paitsi jos altistus kestää yli kuusi tuntia. Vettä saa antaa koko kehoon kohdistuvan altistuksen ajan.

15. Valituilla tavoitepitoisuuksilla tulee voida tunnistaa kohde-elin (-elimet) ja osoittaa selvä pitoisuus-vaste:

— Suurimman pitoisuuden tulee aiheuttaa myrkyllisiä vaikutuksia, mutta ne eivät saa lievittyä tai aiheuttaa kuolleisuutta, koska se estää mielekkään arvioinnin.

— Keskisuuri pitoisuus (keskisuuret pitoisuudet) on valittava siten, että myrkylliset vaikutukset porrastuvat pienimmän ja suurimman pitoisuuden välille.

— Pienimmän pitoisuuden tulee aiheuttaa vain vähän tai ei lainkaan oireita myrkyllisyydestä.

Eläinten lopettaminen tutkimuksen aikana

16. Jos eläimiä suunnitellaan lopetettavaksi tutkimuksen aikana, eläinten lukumäärää kullakin altistustasolla on lisättävä lopetettujen eläinten lukumäärää vastaavasti ennen tutkimuksen päättämistä. Tutkimuksen aikana tapahtuville lopetuksille on esitettävä perustelut, ja niistä on laadittava myös asianmukaiset tilastolliset analyysit.

▼M4

Satelliittitutkimus (vaikutusten korjaantuvuus)

17. Satelliittitutkimuksen (korjaantuvuustutkimuksen) avulla voidaan tarkkailla myrkytysoireiden korjaantuvuutta, pysyvyyttä sekä sitä, esiintyykö viivästyneitä myrkytysoireita käsittelyn jälkeisellä jaksolla, jonka on oltava riittävän pitkä, vähintään kuitenkin 14 päivää. Satelliittiryhmissä (korjaantuvuusryhmissä) on 10 urosta ja 10 naarasta, jotka altistetaan samaan aikaan kuin päätutkimuksen koe-eläimet. Satelliittitutkimuksen (korjaantuvuustutkimuksen) ryhmät on altistettava testikemikaalille suurimmalla pitoisuudella, ja tarvittaessa tutkimuksissa on oltava rinnakkaiset ilma- ja/tai kantaja-aineverrokit (katso 18 kohta).

Verrokkieläimet

18. Rinnakkaisryhmien negatiivisia (ilma)verrokkieläimiä on käsiteltävä samalla tavalla kuin testiryhmän eläimiä muutoin paitsi että ne altistetaan suodatetulle ilmalle testikemikaalin sijasta. Jos testi-ilmakehän tuottamisessa käytetään apuna vettä tai muuta ainetta, tutkimukseen on sisällytettävä kantaja-aineverrokkiryhmä negatiivisen (ilma)verrokkiryhmän sijasta. Kantaja-aineena on käytettävä vettä, mikäli mahdollista. Jos kantaja-aineena käytetään vettä, verrokkieläimet on altistettava ilmalle, jonka suhteellinen kosteus on sama kuin altistusryhmissä. Sopiva kantaja-aine on valittava asianmukaisesti toteutetun esitutkimuksen tai aiempien tietojen pohjalta. Jos kantaja-aineen myrkyllisyyttä ei tiedetä, tutkimuksen johtaja voi päättää käyttää sekä negatiivista (ilma)verrokkiryhmää ja kantaja-aineverrokkiryhmää, joskaan se ei ole suositeltavaa. Jos aiemmat tiedot osoittavat, että kantaja-aine on myrkytön, negatiivista (ilma)verrokkiryhmää ei tarvita, ja tällöin tulee käyttää vain kantaja-aineverrokkia. Jos esitutkimus osoittaa, ettei kantaja-aineessa oleva testikemikaali ole myrkyllinen, se tarkoittaa sitä, että kantaja-aine on myrkytön testatulla pitoisuudella, ja tällöin on käytettävä tätä kantaja-aineverrokkia.

ALTISTUSOLOSUHTEET

Pitoisuuksien annostelu

19. Eläimet altistetaan testikemikaalille, kun se on kaasuna, höyrynä, aerosolina tai niiden sekoituksena. Testattava fyysinen olomuoto määräytyy testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, valitun pitoisuuden ja/tai testikemikaalin käsittelyssä ja käytössä todennäköisen fyysisen muodon perusteella. Hygroskooppiset ja kemiallisesti reaktiiviset testikemikaalit on testattava kuivaa ilmaa käyttäen. Räjähtävien pitoisuuksien tuottamista on vältettävä huolellisesti. Hiukkasmateriaaleja voidaan joutua käsittelemään mekaanisesti, jotta hiukkaskokoa voidaan pienentää. Lisätietoja on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Hiukkaskokojakauma

20. Hiukkasten koko on mitattava kaikista aerosoleista ja sellaisista höyryistä, jotka voivat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Jotta kaikki hengityselimistön oleelliset osat altistuvat aineelle, on suositeltavaa käyttää aerosoleja, joiden massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) on 1–3 μm ja joiden geometrinen keskihajonta (σ_g) sijoittuu välille 1,5–3,0 (4). Tämä vaatimus on pyrittävä täyttämään kaikin keinoin, mutta jos se ei onnistu, on esitettävä asiantuntijan lausunto. Esimerkiksi metallihuurut voivat olla tätä vaatimusta pienempiä, kun taas varautuneet hiukkaset ja kuidut voivat olla vaatimusta suurempia.

▼M4

Testikemikaalin valmistelu kantaja-aineessa

21. Testikemikaali on testattava mielellään ilman kantaja-ainetta. Jos kantaja-aineen käyttö on tarpeellista asianmukaisen testikemikaalipitoisuuden ja hiukkaskoon tuottamiseksi, on käytettävä ensisijaisesti vettä. Aina kun testikemikaali liuotetaan kantaja-aineeseen, sen stabiilius on osoitettava.

ALTISTUSOLOSUHTEIDEN SEURANTA

Kammion ilmavirtaus

22. Ilman virtausta altistuskammion läpi on valvottava tarkasti ja seurattava jatkuvasti, ja sitä koskevat tiedot on kirjattava vähintään kerran tunnissa jokaisen altistuksen aikana. Testi-ilmakehän pitoisuuden (tai ajallisen stabiiliuden) reaaliaikainen seuranta kuuluu olennaisena osana kaikkien dynaamisten parametrien mittaamiseen, ja se on myös epäsuora keino valvoa kaikkia oleellisia dynaamisia inhalaatioparametreja. Jos pitoisuutta seurataan reaaliajassa, ilmavirtausten mittaustaajuutta voidaan vähentää yhteen mittaukseen altistusta kohti päivässä. Erityistä huomiota on kiinnitettävä siihen, että uudelleenhengittäminen vältetään vain nasaalisesti -altistuksen kammioissa. Happipitoisuuden on oltava vähintään 19 prosenttia, eikä hiilidioksidipitoisuus saa ylittää yhtä prosenttia. Jos on aihetta olettaa, ettei näitä vaatimuksia voida täyttää, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet on mitattava. Jos ensimmäisenä altistuspäivänä tehdyt mittaukset osoittavat, että näiden kaasujen pitoisuus on asianmukainen, myöhemmät mittaukset eivät välttämättä ole tarpeen.

Kammion lämpötila ja suhteellinen kosteus

23. Kammion lämpötila on pidettävä välillä 22 ± 3 °C. Eläinten hengitysilman suhteellista kosteutta on seurattava sekä nasaalisissa että koko kehoon kohdistuvissa altistuksissa, ja se on kirjattava kerran tunnissa kunkin altistuksen aikana, mikäli mahdollista. Suhteellisen kosteuden tulisi olla välillä 30–70 prosenttia, mutta tämä ei ole välttämättä mahdollista (esimerkiksi testattaessa vesipohjaisia seoksia) tai mitattavissa, koska testikemikaali häiritsee testimenetelmää.

Testikemikaali: nimellispitoisuus

24. Aina kun mahdollista, altistuskammion nimellispitoisuus on laskettava ja kirjattava. Nimellispitoisuus on tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammiojärjestelmän läpi virtaavan ilman kokonaistilavuudella. Nimellispitoisuudella ei luonnehdita eläinten altistumista, vaan nimellispitoisuuden ja varsinaisen pitoisuuden vertailusta saadaan tietoa testijärjestelmän generointitehokkuudesta, ja sitä voidaan siis käyttää generointiongelmien havaitsemiseen.

Testikemikaali: todellinen pitoisuus

25. Todellinen pitoisuus on testikemikaalin pitoisuus eläinten hengitysilmassa inhalaatiokammiossa. Todelliset pitoisuudet saadaan tietyillä menetelmillä (esimerkiksi suoralla näytteenotolla, adsorptiivisilla tai kemiallisesti reaktiivisilla menetelmillä ja tulosten analyyttisella luonnehtimisella) tai muilla menetelmillä, kuten suodatukseen perustuvalla gravimetrisella analyysilla. Gravimetrisen analyysin käyttö on hyväksyttävää vain yksikomponenttisten jauhemaisten aerosolien tai heikosti haihtuvista nesteistä koostuvien aerosolien yhteydessä, ja sitä on tuettava asianmukaisella esitutkimuksella, jossa käsitellään testikemikaalia koskevia luonnehdintoja. Monikomponenttisten jauhemaisten aerosolien pitoisuus voidaan myös määrittää gravimetrisen

▼M4

analyysin avulla. Siihen tarvitaan kuitenkin analyysitietoja, jotka osoittavat, että ilmassa leijuvan materiaalin koostumus on sama kuin lähtömateriaalin. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, testikemikaali voi olla tarpeen analysoida uudelleen (mieluiten ilmassa leijuvassa muodossaan) säännöllisin väliajoin tutkimuksen aikana. Sellaisten aerosolisoituvien aineiden osalta, jotka voivat höyrystyä tai sublimoitua, on osoitettava, että valitulla menetelmällä kerättiin kaikki faasit.

26. Jos mahdollista, koko tutkimuksen keston ajan on käytettävä yhdestä erästä peräisin olevaa testikemikaalia, ja testinäyte on säilytettävä sen puhtauden, homogeenisuuden ja stabiiliuden säilyttävissä olosuhteissa. Ennen tutkimuksen aloittamista testikemikaalista on laadittava luonnehdinta, johon on sisällyttävä sen puhtaus ja – mikäli teknisesti mahdollista – identiteetti sekä tunnistettujen kontaminanttien ja epäpuhtauksien määrät. Tämä voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavien tietojen avulla: retentioaika ja piikin suhteellinen pinta-ala sekä molekyylipaino, joka on saatu massaspektroskopialla tai kaasukromatografia-analyyseista, tai muut estimaatit. Vaikka testinäytteen identiteetti ei kuulu testauslaboratorion vastuulle, sen voi olla järkevää vahvistaa rahoittajan laatima luonnehdinta ainakin joiltain osin (esimerkiksi väri, fysikaalinen olomuoto jne.).

27. Altistusilmakehä on pidettävä mahdollisimman muuttumattomana. Altistusolosuhteiden stabiiliuden osoittamiseen voidaan käyttää reaaliaikaista seurantalaitetta, kuten aerosolifotometria aerosoleille tai hiilivetyanalysaattoria höyryille. Kammion todellinen pitoisuus on mitattava vähintään kolme kertaa jokaisena altistuspäivänä ja jokaiselta altistustasolta. Jos se ei ole mahdollista pienen ilmavirtauksen tai pienten pitoisuuksien vuoksi, yksi näyte altistuskertaa kohti hyväksytään. Tällöin tämä näyte on mielellään kerättävä koko altistuskerran ajalta. Yksittäiset kammion pitoisuusnäytteet eivät saa poiketa keskimääräisestä pitoisuudesta enempää kuin enintään ± 10 prosenttia kaasujen ja höyryjen osalta tai enintään ± 20 prosenttia nestemäisten tai kiinteiden aerosolien osalta. Kammion tasapainotukseen kulunut aika (t_{95}) on laskettava ja kirjattava. Altistuksen kesto käsittää ajan, jolloin testikemikaali muodostetaan. Tässä otetaan huomioon hajoamiseen ja kammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95}). Ohjeita t_{95}-ajan arvioimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

28. Hyvin monimutkaisten, kaasuista/höyryistä koostuvien seosten ja aerosolien (esimerkiksi polttokammiot ja tietyn tarkoituksen mukaisten lopputuotteiden/-laitteiden perusteella kehitetyt testikemikaalit) osalta kukin faasi voi käyttäytyä inhalaatiokammiossa eri tavoin. Sen vuoksi jokaisesta faasista (kaasu/höyry ja aerosoli) on valittava vähintään yksi indikaattoriaine (analyytti), yleensä seoksen pääasiallinen vaikuttava aine. Kun testikemikaali on seos, on ilmoitettava koko seoksen analyyttinen pitoisuus, ei siis pelkästään vaikuttavan aineen tai indikaattoriaineen (analyytin) pitoisuutta. Lisätietoja todellisista pitoisuuksista on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Testikemikaali: hiukkaskokojakauma

29. Aerosolien hiukkaskokojakauma on määritettävä vähintään kerran viikossa jokaisesta pitoisuudesta käyttämällä kaskadierotinta tai jotain vaihtoehtoista laitetta, kuten aerodynaamista hiukkaskokoluokittelijaa. Jos kaskadierottimella tai muulla laitteella saatujen tulosten välinen vastaavuus voidaan osoittaa, vaihtoehtoista laitetta voidaan käyttää koko tutkimuksen ajan.

▼M4

30. Ensisijaisen laitteen rinnalla on käytettävä toissijaista laitetta, esimerkiksi gravimetrista suodatinta tai törmäytintä/kuplituslaitetta ensisijaisen laitteen keräystehon vahvistamiseksi. Hiukkaskoon analyysista saadun massapitoisuuden on sijoituttava kohtuullisessa määrin suodatusanalyysilla saadun massapitoisuuden rajoihin [katso GD 39 (2)]. Jos vastaavuus voidaan osoittaa kaikkien pitoisuuksien osalta tutkimuksen varhaisessa vaiheessa, myöhemmät vahvistavat mittaukset voidaan jättää tekemättä. Eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi on pyrittävä minimoimaan epävarmat tiedot, jotta altistusta ei tarvitse toistaa.

31. Höyryjen osalta hiukkaskoko on määritettävä, jos on mahdollista, että höyryn tiivistyessä muodostuu aerosolia, tai jos höyryatmosfäärissä, jossa faasien sekoittuminen on mahdollista, havaitaan hiukkasia.

HAVAINNOT

32. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti ja säännöllisesti ennen altistusjaksoa, sen aikana ja sen jälkeen. Tiiviimpi tarkkailu voi olla aiheenmukaista sen perusteella, millainen vaste eläimille muodostuu altistuksen aikana. Kun eläinten tarkkailu ei ole mahdollista immobilisointiputkien, huonosti valaistujen koko kehon altistuskammioiden tai läpinäkymättömien ilmakehien vuoksi, eläimiä on tarkkailtava huolellisesti altistuksen jälkeen. Myrkyllisten vaikutusten korjaantuvuutta tai pahenemista voidaan arvioida ennen seuraavan päivän altistusta tehtävillä havainnoilla.

33. Kaikki havainnot kirjataan jokaisesta eläimestä erikseen. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

34. Häkin vieressä tehtyihin havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, hermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljenerityksen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Lämmön mittaaminen peräsuolesta voi antaa tukevaa näyttöä refleksinomaisesta bradypneasta tai käsittelyyn tai ahtaaseen tilaan liittyvästä tai hypo-/hypertermiasta. Tutkimussuunnitelmaan voidaan sisällyttää muita arviointeja, kuten kinetiikka, biomonitorointi, keuhkojen toiminta, huonosti liukenevien, keuhkokudokseen kertyvien materiaalien retentio sekä käyttäytymisen muutokset.

RUUMIINPAINOT

35. Eläinyksilöiden painot on kirjattava vähän ennen ensimmäistä altistusta (päivä 0) ja sen jälkeen kahdesti viikossa (esimerkiksi perjantaisin ja maanantaisin, jotta voidaan osoittaa toipuminen altistuksettoman viikonlopun tai tietyn ajan jälkeen systeemisen toksisuuden arvioimiseksi) sekä kuolinhetkellä tai lopettamisen yhteydessä. Jos eläimessä ei ilmene vaikutuksia neljän ensimmäisen viikon aikana, ruumiinpainot voidaan punnita kerran viikossa tutkimuksen loppuun saakka. Satelliittiryhmän (korjaantuvuusryhmän) eläinten (jos käytössä) punnitsemista viikoittain on jatkettava koko toipumisjakson ajan. Tutkimuksen päättyessä kaikki eläimet on punnittava vähän ennen niiden lopettamista, jotta elinten ja ruumiinpainon väliset suhteet voidaan laskea ilman vääristymiä.

RAVINNON JA VEDEN KULUTUS

36. Ravinnon kulutus on mitattava viikoittain. Myös veden kulutus voidaan mitata.

▼M4

KLIININEN KEMIA

37. Kaikista eläimistä, myös verrokki- ja satelliittiryhmän (korjaantuvuusryhmän) eläimistä, on tehtävä kliinis-kemialliset arvioinnit, kun ne lopetetaan. Altistuksen päättymisen ja verinäytteen ottamisen välinen aika on merkittävä muistiin varsinkin, jos kyseinen tutkittava ominaisuus rekonstituoituu nopeasti. Niistä parametreista, joiden puoliintumisaika plasmassa on lyhyt (esimerkiksi COHb, CHE ja MetHb), on syytä ottaa näyte heti altistuksen päätyttyä.

38. Taulukossa 1 luetellaan ne kliinis-kemialliset parametrit, jotka yleensä vaaditaan kaikissa toksikologisissa tutkimuksissa. Virtsa-analyysia ei yleensä tarvita. Se tehdään silloin, kun oletettu tai todettu myrkyllisyys antaa siihen aihetta. Jotta testikemikaalin myrkyllisyyttä voitaisiin luonnehtia tarkemmin, tutkimuksen johtaja voi päättää arvioida myös muita parametreja (esimerkiksi koliiniesteraasi, lipidit, hormonit, happo-emästasapaino, methemoglobiini tai Heinzin kappaleet, kreatiinikinaasi, myelosyyttien ja punasolujen suhde, troponiinit, valtimoverikaasut, laktaattidehydrogenaasi, sorbitolidehydrogenaasi, glumaattidehydrogenaasi ja gammaglutamyylitranspeptidaasi).

Taulukko 1

Kliinis-kemialliset vakioparametrit

Hematologia	
Punasolujen määrä	Valkosolujen kokonaismäärä
Hematokriitti	Valkosolujen erittely
Hemoglobiinipitoisuus	Verihiutaleiden määrä
Keskihemoglobiini (MCH)	Hyytymisominaisuudet (valittava yksi):
Punasolujen keskimääräinen tilavuus (MCV)	— Protrombiiniaika
Keskihemoglobiinikonsentraatio (MCHC)	— Hyytymisaika
Retikulosyytit	— Partiaalinen tromboplastiiniaika

Kliininen kemia	
Glukoosi (*)	Alaniiniaminotransferaasi
Kokonaiskolesteroli	Aspartaattiaminotransferaa–si
Triglyseridit	Alkaalifosfataasi
Veren ureatyppi	Kalium
Kokonaisbilirubiini	Natrium
Kreatiniini	Kalsium
Kokonaisproteiini	Fosfori
Albumiini	Kloridi
Globuliini	

Virtsa-analyysi (valinnainen)	
Ulkonäkö (väri ja sameus)	Kokonaisproteiini
Määrä	Glukoosi
Ominaistiheys tai osmolaliteetti	Veri/verisolut
pH	

(*) Koska pitkähkö paastojakso voi vääristää glukoosinmittauksen tuloksia (käsitellyt eläimet vs. verrokkieläimet), tutkimuksen johtajan on päätettävä, onko eläinten pitäminen ravinnotta tarpeen. Jos paastojaksoa käytetään, sen on oltava käytetyille lajeille sopiva, esimerkiksi rotalle paastoajan pituus voi olla 16 h (ravinnotta yli yön). Paastoverensokeri voidaan määrittää yli yön toteutetun paaston jälkeen viimeisellä altistusviikolla tai yli yön paastoamisen jälkeen ennen ruumiinavausta (jälkimmäisessä tapauksessa on määritettävä myös kaikki muut kliinis-kemialliset parametrit).

▼M4

39. Jos on todisteita siitä, että alemmat hengitystiet (esimerkiksi keuhkorakkulat) ovat ensisijainen kertymä- ja retentiopaikka, bronkoalveolaarinen huuhtelu voi olla sopiva tekniikka analysoida määrällisesti hypoteesiperusteiset annos-vaikutus-parametrit, jotka kohdistuvat keuhkorakkulatulehdukseen, keuhkotulehdukseen ja fosfolipidoosiin. Tämän avulla voidaan testata annosvaste ja keuhkorakkuloiden vaurioiden ajalliset muutokset. Huuhtelunesteestä voidaan analysoida valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erottelu, kokonaisproteiini ja laktaattidehydrogenaasi. Lisäksi voidaan analysoida parametreja, jotka viittaavat lysosomien vaurioihin, fosfolipidoosiin, fibroosiin sekä ärsytyksen aiheuttamaan tai allergiseen tulehdukseen, johon voi sisältyä esitulehduksellisten sytokiinien/kemokiinien määritys. Bronkoalveolaariseen huuhteluun perustuvat mittaukset yleensä täydentävät histopatologisten tutkimusten tuloksia mutta eivät korvaa niitä. Ohjeita keuhkohuuhtelun tekemisestä on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

OFTALMOLOGINEN TUTKIMUS

40. Kaikilta eläimiltä on tutkittava silmänpohjat, taittavat väliaineet, värikalvot ja sidekalvot oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testikemikaalin antamista ja testin lopussa kaikilta suuren annoksen ryhmään ja verrokkiryhmään kuuluvilta eläimiltä. Jos silmissä havaitaan muutoksia, kaikki muiden ryhmien eläimet on tutkittava, myös satelliittiryhmä (korjaantuvuusryhmä).

MAKROSKOOPPISET MUUTOKSET JA ELINTEN PAINOT

41. Kaikille koe-eläimille, myös kokeen aikana kuolleille tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi lopetetuille ja tutkimuksesta poistetuille, on tehtävä täydellinen verenlasku ja ruumiinavaus. Jokaisen eläimen viimeisen altistuksen ja lopetuksen välinen aika on merkittävä muistiin. Jos ruumiinavausta ei voida tehdä heti kuolleen eläimen löytämisen jälkeen, eläintä on säilytettävä riittävän kylmässä lämpötilassa (ei pakastimessa) autolyysin minimoimiseksi. Ruumiinavaukset on tehtävä mahdollisimman pian, yleensä yhden tai kahden päivän kuluessa. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata, ja erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteissä oleviin muutoksiin.

42. Taulukossa 2 on lueteltu kaikki elimet ja kudokset, jotka on säilytettävä sopivassa aineessa histopatologista tutkimusta varten. [Hakasulkeisiin] merkittyjen elinten ja kudosten säilyttämisestä päättää tutkimuksen johtaja. **Lihavoidut** elimet ja kudokset on puhdistettava ja punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen välttämiseksi. Kilpirauhanen ja lisäkivekset on punnittava vain tarvittaessa, koska puhdistuksen aiheuttamat vahingot voivat estää histopatologisen arvioinnin. Kudokset ja elimet on kiinnitettävä 10-prosenttisella puskuroidulla formaliinilla tai muulla sopivalla kiinnitysaineella heti ruumiinavauksen jälkeen, vähintään 24–48 tuntia ennen puhdistusta sen mukaan, mitä kiinnitysainetta käytetään.

▼M4

Taulukko 2

Ruumiinavauksen aikana säilöttävät elimet ja kudokset

Lisämunuaiset	Ruokatorvi
Aortta	[Hajurauhanen]
Luuydin (ja/tai tuore aspiraatti)	**Munasarjat**
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Haima
Umpisuoli	Lisäkilpirauhanen
Paksusuoli	Ääreishermo (lonkka- tai säärihermo, mieluiten lihaksen läheltä)
Pohjukaissuoli	Aivolisäke
[**Lisäkivekset**]	Eturauhanen
[Silmät (verkkokalvo, silmähermo) ja silmäluomet]	Peräsuoli
Reisiluu ja polvinivel	Sylkirauhaset
Sappirakko (jos olemassa)	Rakkularauhaset
[Harderin rauhaset]	Iho
Sydän	Selkäydin (kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)
Sykkyräsuoli	**Perna**
Tyhjäsuoli	Rintalasta
Munuaiset	Maha
[Kyynelrauhaset (ekstraorbitaalisesti)]	Hampaat
Kurkunpää (kolmesta kohdasta, joista yhden oltava kurkunkansi)	**Kivekset**
Maksa	**Kateenkorva**
Keuhkot (kaikki lohkot yhdestä kohdasta, mukaan luettuina pääkeuhkoputket)	**Kilpirauhanen**
Imusolmukkeet keuhkoportin alueelta etenkin huonosti liukenevien hiukkasmaisten testikemikaalien yhteydessä. Tarkempia kokeita ja/tai tutkimuksia, joissa keskitytään immunologiaan, voidaan käyttää myös muita imusolmukkeita esimerkiksi välikarsinan, servikaaliselta/submandibulaariselta ja/tai aurikulaariselta alueelta.	[Kieli]
	Henkitorvi (vähintään kahdesta kohdasta siten, että mukana on yksi pitkittäinen leike harjun läpi ja yksi poikittainen leike)
Imusolmukkeet (distaalisesti aineen antokohdasta)	[Virtsanjohdin]
Rintarauhanen (naaras)	[Virtsaputki]
Lihas (reisi)	Virtsarakko
Nenänielun kudokset (vähintään neljästä kohdasta, yhden kohdan on oltava nenänielukanava ja NALT-imukudos (Nasal Associated Lymphoid Tissue)	**Kohtu**
	Kohde-elimet
	Kaikki silmin havaittavat vauriot ja mitat

▼M4

43. Keuhkot on poistettava kokonaisina, punnittava ja täytettävä sopivalla kiinnitysaineella 20–30 cm:n syvyisen veden paineessa, jotta niiden rakenne säilyy (5). Leikkeet on kerättävä kaikista lohkoista yhdestä kohdasta pääkeuhkoputket mukaan luettuina, mutta jos tehdään keuhkohuuhtelu, huuhtelemattomasta lohkosta on otettava leikkeet kolmesta kohdasta (ei sarjaleikkeitä).

44. Nenänielun kudoksista on tutkittava vähintään neljästä kohdasta otetut näytteet, joista yhden on oltava nenänielukanava (5) (6) (7) (8) (9), jotta levyepiteeli, välimuotoinen epiteeli (värekarvaton hengitysepiteeli), hengitysepiteeli (värekarvallinen), hajuepiteeli sekä imukudos (NALT) (10) (11) voidaan tutkia. Kurkunpäästä on tutkittava kolmesta kohdasta otetut leikkeet, ja yhden niistä on oltava kurkunpään kansi (12). Henkitorvesta on tutkittava vähintään kahdesta kohdasta otetut leikkeet, joista toisen on oltava pitkittäinen leike ekstrapulmonaalisten keuhkoputkien ja henkitorven harjun haarautuman läpi ja toisen poikittaisleike.

HISTOPATOLOGIA

45. Histopatologinen arviointi on tehtävä kaikkien taulukossa 2 lueteltujen elinten ja kudosten osalta niin verrokkiryhmästä kuin suuren pitoisuuden ryhmästä sekä kaikista eläimistä, jotka kuolevat tai jotka lopetetaan tutkimuksen aikana. Erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteihin, kohde-elimiin ja näkyviin vammoihin. Ne elimet ja kudokset, joissa suuren pitoisuuden ryhmän eläimillä on leesioita, on tutkittava kaikista ryhmistä. Tutkimuksen johtaja voi päättää toteuttaa histopatologiset arvioinnit myös muista ryhmistä selvän pitoisuus-vasteen osoittamiseksi. Kun tutkimukseen sisältyy satelliittiryhmä (korjaantuvuus), sellaiset kudokset ja elimet, joissa ilmenee samoja vaikutuksia kuin käsitellyillä ryhmillä, on tutkittava histopatologisesti. Jos suuren pitoisuuden ryhmässä on hyvin paljon varhaisia kuolemantapauksia tai muita ongelmia, jotka vaarantavat tietojen merkityksellisyyden, seuraava pienemmän pitoisuuden ryhmä on tutkittava histopatologisesti. Silmämääräisten havaintojen ja mikroskooppisten löydösten välille on pyrittävä löytämään korrelaatio.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

46. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava seuraavat tiedot: ruumiinpaino, ravinnonkulutus, kliinispatologiset tiedot, makroskooppiset muutokset sekä histopatologiset löydökset. Kliiniset havaintotiedot tulee esittää yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin koeryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, toksisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset. Kaikki tulokset, niin määrälliset kuin satunnaiset, on arvioitava sopivalla tilastomenetelmällä. Kaikkia yleisesti hyväksyttyjä tilastomenetelmiä voi käyttää, ja ne on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

Testiraportti

47. Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet ja niiden hoito

— kuvaus häkkiolosuhteista, mukaan luettuina seuraavat tiedot: yhdessä häkissä olevien eläinten lukumäärä (tai lukumäärän muutos), alustamateriaali, lämpötila ja suhteellinen kosteus, valoisa aika ja tiedot ravinnosta

▼M4

— käytetyt lajit/kanta ja perustelu muun lajin kuin rotan käyttämiselle tietoja lähteestä ja aiemmin saatuja tietoja voi ilmoittaa, jos ne koskevat eläimiä, jotka on altistettu samankaltaisessa altistuksessa ja joiden asumis- ja paasto-olosuhteet ovat olleet samat

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— satunnaistamismenetelmä

— kuvaus testiä edeltäneestä tilanteesta ja tiedot ravinnosta, karanteenista ja sairauden hoidosta.

Testikemikaali

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (mukaan luettuna isomeria)

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään.

Kantaja-aine

— perustelut kantaja-aineen käyttämiselle ja sen valinnalle (jos se on muu kuin vesi)

— aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saadut tiedot, jotka osoittavat, ettei kantaja-aine vaikuta tutkimuksen tulokseen.

Inhalaatiokammio

— yksityiskohtainen kuvaus inhalaatiokammiosta, mukaan luettuina tilavuus ja kaavakuva

— kuvaus eläinten altistukseen ja ilmakehän tuottamiseen käytetystä laitteistosta ja sen alkuperä

— lämmön, kosteuden, hiukkaskoon ja todellisen pitoisuuden mittauslaitteet

— ilman lähde ja ilmanvaihtojärjestelmä

— menetelmät, joilla laitteisto on kalibroitu yhtenäisen testi-ilmakehän varmistamiseksi

— paine-ero (yli- vai alipaine)

— kunkin kammion altistusportit (vain nasaalinen altistus); eläinten sijainti kammiossa (koko kehoon kohdistuva altistus)

— testi-ilmakehän stabiilius

— lämpötila- ja kosteusantureiden sekä testi-ilmakehän näytteenottopaikan sijainti kammiossa

— tulo- ja poistoilman käsittely

— ilman virtausnopeudet, ilman virtausnopeus kussakin altistusportissa (vain nasaalinen altistus) tai eläinkuorma/kammio (koko kehoon kohdistuva altistus)

— inhalaatiokammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95})

— tilavuuden muutosten määrä tunneittain

— annostelulaitteet (tarvittaessa).

Altistustiedot

— päätutkimuksen tavoitepitoisuuden valinnan peruste

▼M4

— nimellispitoisuudet (altistuskammioon tuotetun testikemikaalin kokonaismassa jaettuna kammion läpi virtaavan ilman tilavuudella)

— eläinten hengitysilmasta kerätyt testikemikaalin todelliset pitoisuudet; epäyhtenäisiä fyysisiä muotoja (kaasuja, höyryjä, aerosoleja) tuottavien seosten osalta jokainen voidaan analysoida erikseen

— kaikki ilmapitoisuudet on ilmoitettava mieluummin massayksikköinä (esimerkiksi mg/l, mg/m^3, jne.) kuin tilavuusyksikköinä (ppm, ppb jne.)

— hiukkaskokojakauma, massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (σg) sekä niiden laskentamenetelmät; yksittäiset hiukkaskokoanalyysit on myös esitettävä.

Testiolosuhteet

— tiedot testikemikaalin valmistelusta, mukaan luettuina tiedot kiinteiden materiaalien hiukkaskoon pienentämisessä tai testikemikaaliliuosten valmistamisessa käytetyistä menetelmistä

— (mieluiten kaavion sisältävä) kuvaus testi-ilmakehän tuottamiseen ja eläinten altistamiseen testi-ilmakehälle käytetystä laitteistosta

— yksityiskohdat kammion lämpötilan, kosteuden ja ilmanvirtauksen seuraamiseen käytetystä laitteistosta (esimerkiksi kalibrointikäyrän laatiminen)

— yksityiskohdat kammion pitoisuuden ja hiukkaskokojakauman määrittämisessä tarvittavien näytteiden keräämiseen tarkoitetusta laitteistosta

— tiedot käytetystä kemiallisesta analyysimenetelmästä ja sen validointimenetelmästä (myös tiedot siitä, miten tehokasta testikemikaalin saanto oli näytteenottokohdasta)

— satunnaistamismenetelmä, jolla eläimet jaettiin testi- ja verrokkiryhmiin

— tiedot ravinnon ja veden laadusta (sekä ravinnon tyyppi/lähde, veden lähde)

— testipitoisuuksien valintaperuste.

Tulokset

— kammion lämpötila, kosteus ja ilmanvirtaus (taulukkomuodossa)

— tiedot nimellisistä ja todellisista pitoisuuksista kammiossa (taulukkomuodossa)

— hiukkaskokotiedot sekä analyyttiset tiedot näytteen keräämisestä, hiukkaskokojakaumasta ja MMAD-arvon ja σ_g-arvon laskelmat (taulukkomuodossa)

— kunkin eläimen vastetulosten ja pitoisuustason taulukot (ts. eläimet, joilla ilmeni toksisuusoireita, mukaan lukien kuolleisuus, vaikutusten luonne, vaikeusaste, alkamisajankohta ja kesto)

▼M4

— taulukko kunkin eläimen painoista

— taulukko ravinnonkulutuksesta

— taulukko kliinis-kemiallisista tiedoista

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla.

Tulosten pohdinta ja tulkinta

— On kiinnitettävä erityistä huomiota niiden menetelmien kuvaukseen, joita tämän testimenetelmän vaatimusten (rajapitoisuus tai hiukkaskoko) täyttämisessä käytettiin.

— Hiukkasten hengitettävyyttä on käsiteltävä kaikkien löydösten kannalta etenkin, jos hiukkaskokoon liittyvää kriteeriä ei voitu täyttää.

— Tutkimuksen kokonaisarviointiin on sisällytettävä tiedot nimellisten ja todellisten pitoisuuksien määrittämiseen käytettyjen menetelmien yhtenäisyydestä sekä todellisen ja nimellisen pitoisuuden suhde.

— Raportissa on käsiteltävä myös todennäköistä kuolinsyytä ja pääasiallista vaikutustapaa (systeeminen vs. paikallinen).

— Jos kärsiviä tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavia eläimiä oli lopetettava humaanisti eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (3) olevien perustelujen mukaisesti, siitä on esitettävä selvitys.

— Kohde-elin (-elimet) on määritettävä.

— NOAEL- ja LOAEL-arvot on määritettävä.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan.E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229–258.

6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼**M4**

8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

13) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

B.30 **KROONISET MYRKYLLISYYSTUTKIMUKSET**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 452 (2009). Alkuperäinen testiohje nro 452 hyväksyttiin vuonna 1981. Tämän tarkistetun testimenetelmän B.30 kehittäminen katsottiin tarpeelliseksi, jotta siinä voidaan ottaa huomioon eläinten hyvinvointiin ja sääntelyvaatimuksiin liittyvä viimeaikainen kehitys (1) (2) (3) (4). Tämän testimenetelmän B.30 ajantasaistus on toteutettu yhdessä tässä liitteessä olevan luvun B.32 (Karsinogeenisuustesti) ja luvun B.33 (Yhdistetty krooninen myrkyllisyys/karsinogeenisuustesti) tarkistusten kanssa. Tavoitteena on saada lisää tietoa tutkimuksessa käytetyistä eläimistä ja yksityiskohtaisempaa tietoa annoksen valinnasta. Tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi monien erilaisten kemikaalien, torjunta-aineiden ja teollisuuskemikaalien testauksessa.

2. Koska valtaosa kroonisista myrkyllisyystutkimuksista tehdään jyrsijälajeilla, tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi ensisijaisesti tutkimuksissa, jotka tehdään näillä lajeilla. Jos näitä tutkimuksia on tehtävä muilla lajeilla kuin jyrsijöillä, tässä testimenetelmässä kuvattujen periaatteiden ja menetelmien lisäksi voidaan soveltaa myös tässä liitteessä olevassa luvussa B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) (5) kuvattuja periaatteita ja menetelmiä asianmukaisin muutoksin, kuten OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (Kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelu ja toteutus) (6) on määritelty.

3. Kroonisissa myrkyllisyystutkimuksissa käytettävät kolme pääasiallista antoreittiä ovat suun kautta, ihon kautta ja hengitysteiden kautta. Antoreitti valitaan testattavan kemikaalin fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä ihmisten todennäköisen altistumisreitin mukaan. Lisätietoja altistumisreitin valinnasta on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (6).

4. Tässä testimenetelmässä keskitytään suun kautta altistukseen, koska se on yleisimmin käytetty altistusreitti kroonisissa myrkyllisyystutkimuksissa. Vaikka pitkäaikaiset myrkyllisyystutkimukset, joissa altistus tapahtuu ihon tai hengitysteiden kautta, voivat olla tarpeen ihmisten terveysriskien arvioinnissa ja/tai vaikka niitä voidaan tarvita tiettyjen sääntelyohjelmien nojalla, molemmat altistusreitit ovat teknisesti erittäin monimutkaisia. Tällaiset tutkimukset on suunniteltava tapauskohtaisesti, joskin tässä kuvattu testimenetelmä, joka on tarkoitettu suun kautta -antoreitistä aiheutuvan kroonisen myrkyllisyyden määrittämiseen ja arviointiin, on pohjana hengitysteiden ja/tai ihon kautta tapahtuvaa altistusta koskeville tutkimuksille käsittelyaikoja sekä kliinisiä ja patologisia parametreja koskevien suositusten osalta. Saatavilla on OECD:n ohje testikemikaalien annostelusta hengitysteiden (6) (7) ja ihon kautta (6). Kun suunnitellaan pitempiaikaisia tutkimuksia, joihin liittyy altistus hengitysteiden kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9) sekä OECD:n ohjeasiakirjaa, joka koskee akuuttia testausta hengitysteiden kautta (7). Kun altistustestaus toteutetaan ihon kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.9 (10).

▼M4

5. Kroonisesta myrkyllisyystutkimuksesta saadaan tietoa terveyshaitoista, joita käytetylle lajille todennäköisesti aiheutuu toistuvasta altistuksesta niiden elinkaaren suurimman osan aikana. Tutkimuksesta saadaan tietoa myös testikemikaalin myrkyllisistä vaikutuksista, kohde-elimistä ja kemikaalin mahdollisesta kertymisestä. Lisäksi tutkimuksesta voidaan saada arvio tasosta, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL). Sitä voidaan käyttää määritettäessä turvallisuuskriteerejä ihmisten altistumiselle. Korostettakoon, että eläinten huolellinen kliininen tarkkailu on hyvin tärkeää, jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa.

6. Tämän testimenetelmän kattamien tutkimusten tavoitteita ovat seuraavat:

— Testikemikaalin kroonisen myrkyllisyyden määrittäminen

— Kohde-elinten tunnistaminen

— Annos-vaste-suhteen luonnehtiminen

— NOAEL-arvon (tason, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta) määrittäminen tai viiteannoksen (BMD:n) määrittämisen lähtökohta.

— Kroonisten myrkyllisyysvaikutusten ennustaminen ihmisten altistumistasoilla

— Tiedon tuottaminen vaikutustapaa koskevia testihypoteeseja varten (6).

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Kun määritetään ja arvioidaan testikemikaalin myrkyllisiä ominaisuuksia, testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista, jotta tutkimus voidaan suunnitella siten, että mahdollista kroonista myrkyllisyyttä voidaan testata tehokkaasti ja jotta eläinten käyttö voidaan pitää mahdollisimman vähäisenä. Tietoihin, joista on apua tutkimuksen suunnittelussa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tiedot vaikutustavasta, *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (odotettavissa olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista, saatavilla olevat toksikokineettiset tiedot (kerta-annoksen ja myös toistuvan annoksen kinetiikka, jos saatavilla) sekä muista toistuvaa altistusta käsittelevistä tutkimuksista saadut tiedot. Krooninen myrkyllisyys on määritettävä vasta sitten, kun myrkyllisyydestä on saatu alustavia tietoja 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystesteistä, joissa on käytetty toistuvia annoksia. Kroonisen myrkyllisyystestauksen osalta on harkittava vaiheittaista testaustapaa osana tietyn testikemikaalin mahdollisten terveyteen kohdistuvien haitallisten vaikutusten kokonaisarviointia (11) (12) (13) (14).

8. Ennen tutkimuksen aloittamista on määritettävä tulosten analysointiin sopivimmat tilastomenetelmät koejärjestelyt ja tavoitteet huomioon ottaen. Tässä yhteydessä on pohdittava, onko tilastoihin sisällytettävä eloonjäämistä koskeva korjaus ja analyysi, jos testi päättyy yhden tai useamman ryhmän osalta ennenaikaisesti. Asianmukaisia tilastollisia analyyseja koskevia ohjeita sekä keskeiset viitetiedot kansainvälisesti hyväksytyistä tilastomenetelmistä on ohjeasiakirjassa GD 116 (6) sekä ohjeasiakirjassa GD 35, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten analyysia ja arviointia.

▼M4

9. Kroonisia myrkyllisyystutkimuksia tehtäessä on noudatettava aina periaatteita ja näkökohtia, jotka on määritelty OECD:n ohjeasiakirjassa GD 19 (turvallisuuden arvioinneissa käytetyillä koe-eläimillä ilmenevien kliinisten merkkien tunnistaminen, arvioiminen ja käyttäminen humaaneina lopettamiskriteereinä) ja eritoten sen 62 kohdassa. Kyseisessä kohdassa todetaan näin: ”Kun tutkimuksissa, joihin sisältyy toistuvaa annostelua, eläin osoittaa sellaisia kliinisiä merkkejä, jotka ovat progressiivisia ja jotka johtavat eläimen tilan huonontumiseen, on tehtävä tietoon perustuva päätös siitä, tuleeko eläin lopettaa humaaneista syistä. Päätöstä tehtäessä on otettava huomioon, mitä tutkimuksellista arvoa eläimen hengissä pitämisen jatkamisesta saatavalla tiedolla on suhteessa sen yleistilaan. Jos eläin päätetään pitää testissä edelleen, havaintoja on tehtävä tiheämmin, mikäli tarpeen. On myös mahdollista keskeyttää annostus tai pienentää testiannosta väliaikaisesti, mikäli se lievittää tuskia tai kärsimyksiä, ilman että se haittaa testin tarkoitusta.”

10. Tarkempia ohjeita ja kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten annoksen valintaa ohjaavia periaatteita on ohjeasiakirjassa GD 116 (6) sekä kahdessa International Life Sciences Instituten julkaisussa (17) (18). Keskeinen annoksen valintastrategia määräytyy tutkimuksen ensisijaisen tavoitteen tai ensisijaisten tavoitteiden mukaisesti (6 kohta). Asianmukaisia annostasoja valittaessa on pyrittävä saavuttamaan tasapaino yhtäältä vaarojen seulonnan ja toisaalta pieniin annoksiin liittyvien vasteiden ja niiden merkityksen välillä. Tämä on oleellista varsinkin tilanteessa, kun on määrä toteuttaa yhdistetty kroonista myrkyllisyyttä ja karsinogeenisuutta koskeva tutkimus (tämän liitteen luku B.33) (11 kohta).

11. Erillisen kroonisen myrkyllisyystutkimuksen (tämä testimenetelmä B.30) ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.32) sijasta on harkittava yhdistetyn kroonisen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.33) toteuttamista. Kahteen erilliseen tutkimukseen verrattuna yhdistetty tutkimus on ajan ja kustannusten kannalta tehokkaampi, mutta tietojen laatu ei vaarannu kroonisessa vaiheessa tai karsinogeenisuutta käsittelevässä vaiheessa. Kun tehdään yhdistetty krooninen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimus (tämän liitteen luku B.33), on kiinnitettävä erityistä huomiota annoksen valinnan periaatteisiin (9 ja 20–25 kohta). Todettakoon, että tiettyjen sääntelypuitteiden nojalla voidaan edellyttää erillisiä tutkimuksia.

12. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät on esitetty tämän kohdan lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 116 (6).

TESTIN PERIAATE

13. Testikemikaalia annetaan useille koe-eläinryhmille erisuuruisina annoksina joka päivä yleensä 12 kuukauden ajan, joskin on mahdollista valita tätä pidempi tai lyhyempi aika sääntelyvaatimusten mukaisesti (katso 33 kohta). Tämän pituisen ajan katsotaan olevan riittävän pitkä, jotta mahdolliset kumulatiivisen myrkyllisyyden vaikutukset tulevat esiin ilman geriatristen muutosten häiritseviä vaikutuksia. Poikkeukset 12 kuukauden mittaisesta altistuksesta on perusteltava varsinkin, jos altistus on sitä lyhyempi. Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta, mutta myös hengitysteiden tai ihon kautta testaus voi olla asianmukaista. Tutkimussuunnitelmaan voi myös sisältyä yksi tai useampi eläinten lopettamiskerta kesken kokeen esimerkiksi kolmen ja kuuden kuukauden kohdalla, ja tutkimukseen voidaan ottaa lisää eläinryhmiä tämän kompensoimiseksi (katso 19 kohta). Annostelujakson aikana eläimiä havainnoidaan tarkoin myrkyllisyyteen viittaavien oireiden varalta. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

▼M4

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

14. Tämä testimenetelmä koskee ensisijaisesti jyrsijöillä ilmenevän kroonisen myrkyllisyyden määrittämistä ja arviointia (katso 2 kohta), joskin samanlaiset tutkimukset muilla kuin jyrsijöillä saattavat olla tarpeen tietyn lainsäädännön nojalla. Lajin valinta on perusteltava. Tarvittaessa muilla lajeilla kuin jyrsijöillä tehtävät krooniset myrkyllisyystutkimukset on suunniteltava ja toteutettava tässä testimenetelmässä kuvattujen sekä tämän liitteen luvussa B.27 (Oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) kuvattujen periaatteiden mukaisesti Lisätietoja lajin ja kannan valinnasta on ohjeasiakirjassa GD 116 (6).

15. Tässä testimenetelmässä suositeltavin jyrsijälaji on rotta, mutta muitakin jyrsijöitä, esimerkiksi hiirtä, voidaan käyttää. Rottia ja hiiriä on käytetty ensisijaisina koe-eläiminä seuraavista syistä: niiden elinaika on suhteellisen lyhyt, niitä käytetään laajalti farmakologisissa ja toksikologisissa tutkimuksissa, niille muodostuu herkästi kasvaimia, ja saatavilla on kantoja, joita on luonnehdittu riittävästi. Tämän vuoksi niiden fysiologiasta ja patologiasta on saatavana paljon tietoa. Testissä tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koe-eläinkantoja. Kroonisessa myrkyllisyystutkimuksessa on käytettävä eläimiä, jotka ovat samaa kantaa ja samasta lähteestä kuin eläimet, joita käytettiin kestoltaan lyhyemmässä alustavassa myrkyllisyystutkimuksessa (alustavissa myrkyllisyystutkimuksissa). Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

16. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Yksittäin pitämistä on harkittava vain, jos se on tieteellisesti perusteltua (19) (20) (21). Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, tulee kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion on vastattava kaikkia testattujen lajien ravintovaatimuksia. Ruokavalion sisältämien kontaminanttien määrän on oltava mahdollisimman pieni. Tällaisia kontaminantteja, jotka saattavat vaikuttaa testin tuloksiin, ovat esimerkiksi torjunta-ainejäämät, pysyvät orgaaniset yhdisteet, fytoestrogeenit, raskasmetallit ja mykotoksiinit. Ravintoaine- ja kontaminanttipitoisuudesta on tuotettava analyyttista tietoa säännöllisesti, vähintään tutkimuksen alussa ja silloin, kun käytettävä erä muuttuu, ja nämä tiedot on sisällytettävä loppuraporttiin. Yhtä lailla on ilmoitettava analyyttiset tiedot tutkimuksessa käytetystä juomavedestä. Ruokavalion valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa testikemikaalin ja eläinten ravintovaatimusten välinen tasapaino silloin, kun testikemikaalia annetaan ravintoon sekoitettuna.

Eläinten valmistelu

17. Testissä on käytettävä terveitä eläimiä, joita on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään seitsemän vuorokauden ajan ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Jyrsijöiden osalta testikemikaalin antaminen eläimille tulee aloittaa mahdollisimman pian vieroituksen ja totutuksen jälkeen, mielellään ennen kuin eläimet ovat kahdeksanviikkoisia. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja ikä on tunnettava. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun tulee olla mahdollisimman vähäistä, ja se saa vaihdella kummankin käytetyn sukupuolen osalta korkeintaan ± 20 prosenttia kaikkien tutkimuksessa käytettyjen eläinten keskimääräisestä painosta, joka on määritettävä kummallekin sukupuolelle erikseen.

▼M4

Eläimet tulee jakaa verrokki- ja testiryhmään satunnaistetusti. Satunnaistamisen jälkeen kummankaan sukupuolen ryhmissä ei saa olla suuria eroja keskimääräisessä painossa. Jos tilastollisesti merkitseviä eroja on, satunnaistamisvaihe on toistettava, mikäli mahdollista. Kullekin eläimelle tulee antaa oma tunnistenumero, joka on merkittävä eläimeen pysyvästi tatuoimalla, mikrosiruimplantilla tai muulla sopivalla tavalla.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

18. Testissä on käytettävä molempia sukupuolia. Testissä on käytettävä riittävää määrää eläimiä, jotta jokaisessa ryhmässä on tarpeeksi eläimiä tutkimuksen lopussa perusteellista biologista ja tilastollista arviointia varten. Kun tutkimuksessa käytetään jyrsijöitä, jokaisella annostasolla on käytettävä yleensä vähintään 20:tä eläintä kumpaakin sukupuolta. Kun tutkimuksessa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, suositeltava määrä on vähintään neljä eläintä kumpaakin sukupuolta. Tutkimuksissa, joissa käytetään hiiriä, kuhunkin annosryhmään saatetaan tarvita enemmän eläimiä, jotta kaikki vaadittavat hematologiset määritykset saadaan tehtyä.

Eläinten lopettamista kesken tutkimuksen sekä satelliittiryhmiä ja erityisvalvonnassa olevia eläimiä koskeva säännös

19. Tutkimuksessa voidaan hyödyntää mahdollisuutta lopettaa eläimiä kesken tutkimuksen (vähintään 10 eläintä/sukupuoli/ryhmä) esimerkiksi kuuden kuukauden kohdalla, jotta saadaan tietoa toksikologisten muutosten etenemisestä ja mekanistista tietoa, mikäli se on tieteellisesti perusteltua. Jos tällaisia tietoja on jo saatavana aiemmista samaa testikemikaalia koskevista toistetun annoksen myrkyllisyystutkimuksista, eläinten lopettaminen kesken tutkimuksen ei ole välttämättä tieteellisesti perusteltua. Tutkimukseen voidaan sisällyttää myös satelliittiryhmiä, jotta tutkittavana olevan testikemikaalin aiheuttamien toksikologisten muutosten korjaantuvuutta voidaan seurata. Nämä ryhmät rajataan yleensä tutkimuksen suurimman annoksen ryhmään ja verrokkiryhmään. Lisäksi tutkimukseen voidaan sisällyttää ryhmä erityisvalvonnassa olevia eläimiä (yleensä viisi eläintä kumpaakin sukupuolta) sairauden tilan seuraamiseksi tutkimuksen aikana, mikäli tarpeen (22). Jos osa eläimistä aiotaan lopettaa kesken tutkimuksen tai jos tutkimukseen aiotaan sisällyttää satelliittiryhmiä tai erityisvalvonnassa olevien eläinten ryhmiä, tutkimussuunnitelman mukaista eläinten määrää on lisättävä niiden eläinten määrällä, jotka on määrä lopettaa ennen tutkimuksen päättymistä. Näitä eläimiä on yleensä tarkkailtava samalla tavalla kuin päätutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa käytettäviä eläimiä: niiden ruumiinpainoa ja ravinnon-/vedenkulutusta on tarkkailtava ja hematologiset ja kliinis-biokemialliset mittaukset sekä patologiset tutkimukset on tehtävä. Mittaukset voidaan rajata (kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten ryhmissä) tiettyihin keskeisiin seikkoihin, kuten neurotoksisuuteen tai immunotoksisuuteen.

Annosryhmät ja annostus

20. Ohjeita kaikista annoksen valintaan ja annosten porrastamiseen liittyvistä näkökohdista on ohjeasiakirjassa GD 116 (6). Tutkimuksessa on käytettävä vähintään kolmea annostasoa ja samanaikaista verrokkiryhmää, paitsi jos tehdään rajatesti (katso 27 kohta). Annostasot perustuvat yleensä lyhyempien, toistetuilla annoksilla tehdyn testien tai annosalueen määritystestien tuloksiin, ja kaikki mahdolliset testikemikaalista tai samanlaisista kemikaaleista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon.

▼M4

21. Mikäli testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso on yleensä valittava siten, että sen avulla voidaan tunnistaa ensisijaiset kohde-elimet ja myrkylliset vaikutukset ilman, että annos aiheuttaa kärsimyksiä, vakavaa myrkyllisyyttä, sairastuvuutta tai kuolemaa. Kun otetaan huomioon jäljempänä 22 kohdassa esitetyt tekijät, suurin annos on valittava siten, että se aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, mikä näkyy esimerkiksi painon nousun hidastumisena (noin 10 prosentilla).

22. Tutkimuksen tavoitteiden mukaan (katso 6 kohta) suurimmaksi annokseksi voidaan valita myös pienempi annos kuin se, joka aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, jos jokin annos aiheuttaa esimerkiksi huolestuttavan haittavaikutuksen, joka vaikuttaa kuitenkin vain vähän elinaikaan tai ruumiinpainoon. Suurin annos saa olla enintään 1 000 mg painokiloa kohti päivässä (raja-annos, katso 27 kohta).

23. Annostasot ja niiden porrastus voidaan valita annosvasteen ja NOAEL-arvon määrittämisen tai tutkimuksen muun tavoitteen (esimerkiksi viiteannos pienimmällä annostasolla (katso 25 kohta)) perusteella. Pienempien annosten määrittämisessä huomioon otettavia tekijöitä ovat annos-vastekäyrän odotuksenmukainen kulmakerroin, annokset, joiden yhteydessä saattaa ilmetä tärkeitä muutoksia metaboliassa tai myrkyllisen vaikutuksen tavassa, odotuksenmukainen raja-arvo tai arvo, jota pidetään lähtökohtana pienen annoksen ekstrapolaatiolle.

24. Valittu annostason porrastus määräytyy testikemikaalin ominaisuuksien perusteella, eikä sitä voida määrätä tässä testimenetelmässä. Kaksinkertaiset–nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi 6–10-kertaisia annosvälejä). Yleisesti ottaen on pyrittävä välttämään käyttämästä kertoimia, jotka ovat suurempia kuin 10, ja niiden mahdollinen käyttö on perusteltava.

25. Kuten ohjeasiakirjassa GD 116 (6) on täsmennetty, annoksen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— Tunnetut tai oletetut epälineaarisuudet tai käännepisteet annosvasteessa

— Toksikokinetiikka ja pitoisuusalueet, joilla ilmenee tai ei ilmene metabolian induktiota, saturaatiota tai epälineaarisuutta ulkoisten ja sisäisten annosten välillä

— Leesioiden esiasteet, vaikutusten merkkiaineet tai keskeisten biologisten prosessien toimintaa osoittavat indikaattorit

— Vaikutustapaan liittyvät keskeiset (tai oletetut) näkökohdat, kuten annokset, joilla alkaa ilmetä sytotoksisuutta, hormonipitoisuuksien ja homeostaattisten mekanismien häiriintymistä jne.

— Annos-vastekäyrän alueet, joilla tarvitaan erittäin yksityiskohtainen estimointi, esimerkiksi ennakoidun viitearvon tai oletetun raja-arvon kohdalla

— Ihmisten ennakoituja altistumistasoja koskeva pohdinta.

▼M4

26. Verrokkiryhmän tulee olla joko ryhmä, joka ei saa käsittelyä, tai kantaja-ainetta saava ryhmä, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmien eläimiä. Jos käytetään kantaja-ainetta, verrokkiryhmälle tulee antaa tilavuudeltaan suurin annosryhmissä käytetty kantaja-aineannos. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna ja jos se vähentää ravinnonottoa sen vuoksi, ettei ravinto maita eläimelle entiseen tapaan, normaaliravintoa saava verrokkiryhmä voi olla sopivampi.

27. Jos esitutkimuksista saatujen tietojen perusteella voidaan olettaa, ettei yksi annostaso, joka on vähintään 1 000 mg painokiloa kohti päivässä ja joka annetaan tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, todennäköisesti aiheuta haittavaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla kemikaaleilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Tätä rajaa (1 000 mg painokiloa kohti päivässä) sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

Annosten valmistelu ja testikemikaalin antaminen

28. Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta ruoan tai juomaveden seassa tai ruokintaletkulla. Lisätietoja antoreiteistä ja -tavoista on ohjeasiakirjassa GD 116 (6). Antoreitti ja antotapa määräytyvät tutkimuksen tarkoituksen, testikemikaalin fysikaalis- kemiallisten ominaisuuksien ja sen biologisen hyötyosuuden sekä ihmisten yleisimmän altistumisreitin ja -tavan perusteella. Valitulle antoreitille ja -tavalle on esitettävä perustelut. Eläinten hyvinvoinnin vuoksi suun kautta käytettävä ruokintaletku on valittava yleensä vain sellaisille aineille, joiden osalta tämä antoreitti ja -tapa ovat todennäköisesti mahdollisia ihmisten altistumisen yhteydessä (esimerkiksi lääkkeet). Torjunta-aineita sisältävät ravinto- tai ympäristökemikaalit annetaan yleensä ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna. Joidenkin skenaarioiden, kuten työperäisen altistuksen, yhteydessä kemikaalin antaminen muita antoreittejä pitkin voi kuitenkin olla tarkoituksenmukaisempaa.

29. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. Seuraavat mahdolliset kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, metaboliaan tai testikemikaalin pidättymiseen (retentioon) elimistössä; sellaiset vaikutukset testikemikaalin kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyllisiä ominaisuuksia; vaikutukset ravinnon ja veden kulutukseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muita kantaja-aineita. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen myrkylliset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiiliudesta ja annosteluliuosten homogeenisuudesta tai ruokavalioista (tarvittaessa) annosteluolosuhteissa (esimerkiksi ravinto) on oltava saatavilla tietoa.

30. Jos kemikaaleja annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalimäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Pitkäaikaisissa myrkyllisyystutkimuksissa, joissa testikemikaalia annetaan ravinnon seassa, testikemikaalin pitoisuus eläinten ruoassa saa yleensä olla enintään viisi prosenttia kokonaisruokavaliosta, jotta vältetään ravitsemuksellinen epätasapaino. Kun testikemikaali annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (mg/kg-ruokavalio tai ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa (mg painokiloa kohti). Molemmat lasketaan viikoittain. Valittu vaihtoehto on mainittava.

▼M4

31. Suun kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin (seitsemänä päivänä joka viikko) yleensä 12 kuukauden ajan (katso myös 33 kohta), joskin tätä pidempi aika voi olla tarpeen sääntelyvaatimusten perusteella. Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä (jos testikemikaalia annetaan esimerkiksi viitenä päivänä viikossa), se on perusteltava. Ihon kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia vähintään kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, kuten tämän liitteen B.9 luvussa (10) on täsmennetty, vähintään 12 kuukauden ajan. Hengitysteiden kautta altistuksessa testikemikaalia annetaan kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, mutta myös altistusta viitenä päivänä viikossa voidaan käyttää, jos se on perusteltua. Altistusjakso on yleensä 12 kuukautta. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä, se on perusteltava. Katso myös tämän liitteen luku B.8 (8).

32. Kun testikemikaali annetaan eläimille ruokintaletkulla, on käytettävä mahaletkua tai sopivaa intubaatiokanyylia, ja kemikaali on annettava joka päivä samoihin aikoihin. Yleensä kerta-annos annetaan kerran päivässä, mutta jos kemikaali on esimerkiksi paikallisesti ärsyttävä aine, päivittäinen annos voidaan antaa myös jaettuna (kaksi kertaa päivässä). Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Tilavuus tulee pitää mahdollisimman pienenä, ja jyrsijöillä se saa olla yleensä enintään 1 ml 100 g:n painoa kohti (22). Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta sen varmistamiseksi, että tilavuus on sama kaikilla annostasoilla. Poikkeuksena ovat mahdollisesti syövyttävät tai ärsyttävät kemikaalit, jotka on laimennettava vakavien paikallisten vaikutusten välttämiseksi. On vältettävä testausta sellaisilla pitoisuuksilla, jotka todennäköisesti syövyttävät tai ärsyttävät maha-suolikanavaa.

Tutkimuksen kesto

33. Vaikka tämä testimenetelmä on tarkoitettu ensisijaisesti 12 kuukauden mittaiseen krooniseen myrkyllisyystutkimukseen, tutkimussuunnitelman mukaan testimenetelmää on mahdollista soveltaa joko lyhyempiin (esimerkiksi kuusi tai yhdeksän kuukautta) tai pitempiin (esimerkiksi 18 tai 24 kuukautta) tutkimuksiin tietyn lainsäädännön nojalla tai tiettyjen mekanististen tarkoitusten perusteella. Poikkeukset 12 kuukauden mittaisesta altistuksesta on perusteltava varsinkin, jos altistus on tätä lyhyempi. Tutkimukseen sisältyville satelliittiryhmille, joiden avulla seurataan tutkittavan testikemikaalin aiheuttamien toksikologisten muutosten korjaantuvuutta, ei saa antaa testikemikaalia vähintään neljään viikkoon eikä pidempään kuin kolmanneksen tutkimuksen kokonaiskestosta altistuksen päätyttyä. Lisää ohjeita ja tietoa eloonjäämisen käsittelystä tutkimuksessa on ohjeasiakirjassa GD 116 (6).

HAVAINNOT

34. Kaikki eläimet on tutkittava sairastuvuuden tai kuolleisuuden havaitsemiseksi yleensä aamuin illoin joka päivä myös viikonloppuisin ja lomien aikana. Kliinisiä yleishavaintoja on tehtävä vähintään kerran päivässä mieluiten suurin piirtein samaan aikaan / samoihin aikoihin joka päivä. On otettava huomioon, että kun testikemikaalia annetaan ruokintaletkun kautta, odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen.

▼M4

35. Kaikista eläimistä on tehtävä yksityiskohtaisia kliinisiä havaintoja vähintään kerran ennen ensimmäistä altistusta (jotta eläimessä havaittavia muutoksia voidaan verrata alkutilanteeseen), tutkimuksen ensimmäisen viikon päätteeksi ja kerran kuukaudessa sen jälkeen. Havainnointi on toteutettava siten, että yksittäisten havainnoijien välinen vaihtelu on mahdollisimman pientä ja testiryhmästä riippumatonta. Havainnot tulee tehdä eläimen oman häkin ulkopuolella mieluiten vakioalueella samaan kellonaikaan joka kerta. Havainnot on kirjattava tarkoin muistiin, mieluiten koelaboratorion erikseen määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä käyttäen. On pyrittävä varmistamaan, että havainnointiolosuhteissa on mahdollisimman vähän vaihtelua. Kirjattavia havaintoja ovat mm. ihon, karvapeitteen, silmien ja limakalvojen muutokset sekä sisäeritteiden, kuonaeritteiden ja autonomisen toiminnan (esimerkiksi kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko ja epätavallinen hengitys) esiintyminen. Käynnin, asennon ja käsittelyvasteen muutokset, mahdolliset klooniset tai tooniset liikkeet, stereotypiat (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esimerkiksi itsensä silpominen, takaperin käveleminen) tulee myös kirjata muistiin (24).

36. Kaikille eläimille on tehtävä silmätutkimus oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testikemikaalin ensimmäistä antokertaa. Tutkimuksen päätteeksi tämä tutkimus on tehtävä mieluiten kaikille eläimille, mutta vähintään suuren annoksen ryhmässä ja verrokkiryhmässä. Jos silmissä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, kaikki eläimet on tutkittava. Jos rakenteellinen analyysi tai muut tiedot viittaavat silmiin kohdistuvaan myrkyllisyyteen, silmätutkimuksia on tehtävä useammin.

37. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joiden osalta aikaisemmat toistetulla annoksella tehdyt 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystestit osoittivat niiden mahdollisesti aiheuttavan neurotoksisia vaikutuksia, voidaan lisäksi arvioida aistien reaktiivisuus erityyppisille ärsykkeille (24) (esimerkiksi kuulon, näön tai asentotunnon kautta välittyville ärsykkeille) (25), (26), (27), tarttumaotteen voimakkuus (28) ja motorinen toiminta (29) ennen tutkimuksen aloittamista ja kolmen kuukauden välein sen jälkeen, kunnes tutkimus on kestänyt 12 kuukautta, sekä tutkimuksen päättyessä (jos se kestää yli 12 kuukautta). Mahdollisten toimenpiteiden tarkemmat yksityiskohdat löytyvät mainituista kirjallisuusviitteistä. Myös muita kuin viittauksissa mainittuja toimenpiteitä voidaan käyttää.

38. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joiden osalta aikaisemmat toistetulla annoksella tehdyt 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystestit osoittivat niiden mahdollisesti aiheuttavan immunotoksisia vaikutuksia, tätä tutkittavaa ominaisuutta koskevat tarkemmat tutkimukset voidaan tehdä tutkimuksen päättyessä.

Ruumiinpaino, ravinnon/veden kulutus ja ruumiinpainon lisäys

39. Kaikki eläimet on punnittava käsittelyn alussa, vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Ravinnon kulutus ja painon lisäys on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Veden kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuussa, kun kemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna. Veden kulutuksen mittaamista on harkittava myös sellaisissa tutkimuksissa, joissa eläimen juomistottumukset muuttuvat.

▼M4

Hematologia ja kliininen biokemia

40. Tutkimuksissa, joissa käytetään jyrsijöitä, hematologiset tutkimukset on tehtävä vähintään kymmenelle urokselle ja kymmenelle naaraalle kutakin ryhmää kohti, kun tutkimus on kestänyt kolme, kuusi ja kaksitoista kuukautta, sekä tutkimuksen päättyessä (jos se kestää yli 12 kuukautta). Kaikissa verikokeissa on käytettävä samoja eläimiä. Hiirten osalta saatetaan tarvita satelliittiryhmän eläimiä, jotta kaikki vaaditut hematologiset määritykset saadaan tehtyä (katso 18 kohta). Tutkimuksissa, joissa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, näytteet otetaan pienemmästä määrästä eläimiä (esimerkiksi koiratutkimuksissa neljältä eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti) saman näytteenottoaikataulun mukaisesti kuin jyrsijöilläkin sekä tutkimuksen päättyessä. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä jyrsijöillä eikä muilla eläimillä, jos hematologisissa parametreissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Verinäytteet on otettava nimetystä paikasta esimerkiksi sydänpunktiolla tai silmäntakaisesta laskimopunoksesta anestesiassa.

41. Seuraavassa on luettelo parametreista, jotka on tutkittava (30): valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erittelylaskenta, punasolujen määrä, verihiutaleiden määrä, hemoglobiinipitoisuus, hematokriitti (punasolujen tilavuusosuus), punasolujen keskimääräinen tilavuus (MCV), keskihemoglobiini (MCH), keskihemoglobiinikonsentraatio (MCHC), protrombiiniaika ja aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika. Muita hematologisia parametreja (kuten Heinzin kappaleet, epätyypillinen punasolujen morfologia tai methemoglobiini) voidaan tarvittaessa mitata testikemikaalin myrkyllisyyden mukaan. Kaiken kaikkiaan on toimittava joustavasti tietystä kemikaalista havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaisesti. Jos testikemikaali vaikuttaa verta muodostavaan järjestelmään, retikulosyyttien määrän ja luuytimen sytologinen tutkimus voi olla aiheenmukaista, joskaan sitä ei tarvitse tehdä rutiininomaisesti.

42. Kliinis-biokemialliset määritykset tärkeimpien myrkyllisten kudosvaikutusten ja erityisesti munuais- ja maksavaikutusten tutkimiseksi tulee tehdä verinäytteistä, jotka otetaan vähintään kymmeneltä urokselta ja kymmeneltä naaraalta jokaisesta ryhmästä hematologisia tutkimuksia varten määritetyin aikavälein käyttäen aina samoja eläimiä. Hiirten osalta saatetaan tarvita satelliittiryhmän eläimiä, jotta kaikki vaaditut kliinis- biokemialliset määritykset saadaan tehtyä. Tutkimuksissa, joissa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, näytteet otetaan pienemmästä määrästä eläimiä (esimerkiksi koiratutkimuksissa neljältä eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti) saman näytteenottoaikataulun mukaisesti kuin jyrsijöilläkin sekä tutkimuksen päättyessä. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä jyrsijöillä eikä muilla eläimillä, jos kliinisen biokemian parametreissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Eläinten ruokinnan siirtämistä yön yli (hiiriä lukuun ottamatta) ennen verinäytteen ottoa suositellaan. Seuraavassa on luettelo parametreista, jotka on tutkittava (30): glukoosi, virtsa (virtsan typpi), kreatiniini, kokonaisproteiini, albumiini, kalsium, natrium, kalium, kokonaiskolesteroli, vähintään kaksi hepatosellulaariseen arviointiin sopivaa testiä (alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, glutamaattidehydrogenaasi, kokonaissappihapot) (31), ja vähintään kaksi hepatobiliaariseen arviointiin sopivaa testiä (alkalinen fosfataasi, gammaglutamyylitransferaasi, 5'-nukleotidaasi, kokonaisbilirubiini, kokonaissappihapot) (31). Muita kliinis-kemiallisia parametreja, kuten paastotriglyseridit, tietyt hormonit ja koliiniesteraasi, voidaan mitata tarvittaessa testikemikaalin myrkyllisyyden mukaan. Kaiken kaikkiaan on toimittava joustavasti tietystä kemikaalista havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaisesti.

▼M4

43. Virtsa-analyysit on tehtävä vähintään kymmeneltä urokselta ja kymmeneltä naaraalta ryhmää kohti näytteistä, jotka otetaan samoina aikoina kuin hematologiset ja kliinis-kemialliset näytteet. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä, jos virtsa-analyysissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Seuraava parametriluettelo on kliinis-patologisia tutkimuksia koskevan asiantuntijasuosituksen mukainen (30): ulkonäkö, tilavuus, osmolaliteetti tai ominaistiheys, pH, kokonaisproteiini ja glukoosi. Muita määrityksiä ovat ketoaineet, urobilinogeeni, bilirubiini ja piilevä veri. Myös muita parametreja voidaan tarvittaessa käyttää, jos havaitun vaikutuksen (havaittujen vaikutusten) tutkimusta on laajennettava.

44. Koiratutkimuksissa lähtötilanteen hematologiset ja kliinis-biokemialliset muuttujat on yleensä määritettävä ennen käsittelyn aloittamista, mutta jyrsijätutkimuksissa niitä ei tarvitse määrittää (30). Jos aiemmat lähtötason tiedot ovat riittämättömät (katso 50 kohta), näiden tietojen hankkimista on harkittava.

Patologia

Ruumiinavaustutkimukset

45. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Mittaukset voidaan kuitenkin määrätä rajattavaksi (kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten ryhmässä tai satelliittiryhmässä) tiettyihin keskeisiin seikkoihin, kuten neurotoksisuuteen tai immunotoksisuuteen (katso 19 kohta). Näille eläimille ei tarvitse tehdä ruumiinavausta eikä jäljempänä olevissa kohdissa kuvattuja toimenpiteitä. Erityisvalvonnassa olevien eläinten ruumiinavauksen tarve määräytyy tapauskohtaisesti tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella.

46. Elinten painotiedot on kerättävä kaikilta eläimiltä lukuun ottamatta 45 kohdan jälkimmäisessä osassa lueteltuja eläimiä. Lisämunuaiset, aivot, lisäkivekset, sydän, munuaiset, maksa, munasarjat, perna, kivekset ja kilpirauhanen (punnittava kiinnityksen jälkeen lisäkilpirauhasten kanssa) on puhdistettava niihin kiinnittyvistä kudoksista tarkoituksenmukaisella tavalla, ja elinten märkäpaino on punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi. Tutkimuksessa, jossa käytetään hiiriä, lisämunuaisten punnitseminen ei ole pakollista.

47. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (32) (hakasulkeissa olevat kudokset ovat valinnaisia):

Kaikki suuret leesiot	Sydän	Haima	Maha (etumaha, rauhasmaha)
Lisämunuainen	Sykkyräsuoli	Lisäkilpirauhanen	[Hampaat]
Aortta	Tyhjäsuoli	Ääreishermo	Kivekset
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Munuaiset	Aivolisäke	Kateenkorva
Umpisuoli	Kyynelrauhanen (silmän ulkopuolelta)	Eturauhanen	Kilpirauhanen
Kohdunkaula	Maksa	Peräsuoli	[Kieli]

▼M4

Eturauhasen etuosa	Keuhkot	Sylkirauhanen	Henkitorvi
Paksusuoli	Imusolmukkeet (pinnalliset ja syvät)	Rakkularauhanen	Virtsarakko
Pohjukaissuoli	Rintarauhanen (pakollinen naarailta; mikäli selvästi dissekoitavissa, myös uroksilta)	Luurankolihas	Kohtu (mukaan luettuna kohdunkaula)
Lisäkivekset	[Ylähengitystiet, mukaan luettuina nenä, kuorikot ja sivuontelot]	Iho	[Virtsanjohdin]
Silmä (mukaan luettuna verkkokalvo)	Ruokatorvi	Selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)	[Virtsaputki]
[Reisiluu ja nivel]	[Hajurauhanen]	Perna	Vagina
Sappirakko (muut lajit kuin rotta)	Munasarjat	[Rintalasta]	Osa luuydintä ja/tai tuore luuydinaspiraatti
Harderin rauhaset			

Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on säilytettävä. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköiset kohde-elimet on säilytettävä. Tutkimuksissa, joissa altistus tapahtuu ihon kautta, on säilytettävä ne elimet, jotka on lueteltu suun kautta altistuksen yhteydessä. On oleellista, että näyte otetaan nimenomaan siitä kohdasta ihoa, johon testikemikaalia on annosteltu, ja että kyseinen ihokohta säilytetään. Hengityksen kautta altistuksen yhteydessä hengityselimistön säilytettyjen ja tutkittujen kudosten luettelon osalta on noudatettava tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9). Muiden elinten/kudosten osalta (ja hengityselimistöstä otettujen kudosten lisäksi) on tutkittava ne elimet, jotka on mainittu suun kautta altistuksen yhteydessä esitetyssä luettelossa.

Histopatologia

48. Toksikologis-patologisten tutkimusten toteuttamisen parhaista käytännöistä on saatavana ohjeistusta (32). Vähintään seuraavat histopatologiset tutkimukset on tehtävä:

— kaikki kudokset suuren annoksen ryhmästä ja verrokkiryhmästä

— kaikki kudokset tutkimuksen aikana kuolleilta tai lopetetuilta eläimiltä

— kaikki kudokset, joissa on makroskooppisia poikkeavuuksia

— kohdekudokset tai kudokset, joissa oli käsittelyyn liittyviä muutoksia suuren annoksen ryhmässä; kaikilta eläimiltä kaikissa muissa annosryhmissä

— parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on tutkittava.

▼M4

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

49. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava tiedot kaikista arvioiduista parametreista. Yhteenveto tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin testiryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, testin aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, merkkejä myrkyllisyydestä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen myrkyllisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin. Yhteenvetotaulukoissa on ilmoitettava keskiarvot ja keskihajonnat (jatkuvan testin tietojen osalta) niistä eläimistä, joilla ilmeni toksisia vaikutuksia tai vaurioita. Myös vaurioiden vaikeusaste on ilmoitettava.

50. Aiemmista vertailutiedoista voi olla apua tutkimuksen tulosten tulkinnassa esimerkiksi silloin, kun näyttää siltä, että samanaikaisista verrokeista saadut tiedot ovat merkittävästi erilaisia verrattuna saman testilaitoksen/kolonian verrokkieläimiltä saatuihin uudempiin tietoihin. Jos aiempia tietoja arvioidaan, niiden on oltava peräisin samasta laboratoriosta ja liityttävä eläimiin, jotka ovat samanikäisiä ja sellaisesta kannasta, joka on tuotettu kyseistä tutkimusta edeltäneen viiden vuoden aikana.

51. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Tilastolliset menetelmät ja analysoitavat tiedot on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa (8 kohta). Valinnassa on otettava huomioon myös eloonjäämistä koskevat korjaukset, mikäli tarpeen.

Testiraportti

52. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot

— kemikaalin lähde

— eränumero

— todistus kemiallisesta analyysista.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty laji/kanta ja perustelut niiden valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli testin alussa

▼**M4**

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

Testiolosuhteet:

— antoreitin ja annoksen valinnan perustelut

— tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset menetelmät tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta / ravintovalmisteesta

— analyysitiedot valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta sekä sen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

— antoreitti ja yksityiskohdat testikemikaalin annostelusta

— inhalaatiotutkimuksissa tieto siitä, käytettiinkö vain nasaalista altistusta vai koko kehoon kohdistuvaa altistusta

— todelliset annokset (mg painokiloa kohti päivässä) ja muuntokerroin, jolla ravintovalmisteen/juomaveden testikemikaalipitoisuus (mg/kg tai ppm) muunnetaan todelliseksi annokseksi, mikäli tarpeen

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Tulokset (tiedot on esitettävä yhteenvetotaulukossa ja jokaisesta eläimestä erikseen):

— eloonjäämistä koskevat tiedot

— ruumiinpaino / ruumiinpainon muutokset

— ravinnon kulutus, ruumiinpainon lisäystä koskeva laskelmat sekä veden kulutus tarvittaessa

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, mukaan lukien toksisuusoireet

— kliinisten havaintojen luonne, ilmaantuvuus (ja vaikeusaste, jos se on pisteytetty) ja kesto (väliaikaisuus/pysyvyys)

— silmätutkimus

— hematologiset testit

— kliinisen biokemian testit

— virtsa-analyyttiset testit

— neurotoksisuutta tai immunotoksisuutta koskevien tutkimusten tulokset

— eläimen paino testin lopussa

— elinten painot (ja niiden suhteet tarvittaessa)

— ruumiinavauslöydökset

— kaikkien käsittelyyn liittyvien histopatologisten löydösten seikkaperäinen kuvaus

— tiedot imeytymisestä, mikäli saatavilla.

▼M4

Tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa

Tulosten pohdinta, mukaan luettuina seuraavat seikat:

— annos-vastesuhteet

— vaikutustapaa koskeviin tietoihin liittyvä pohdinta

— mallintamistapoja koskeva pohdinta

— BMD-, NOAEL- tai LOAEL-arvojen määritykset

— aiemmat vertailutiedot

— merkitys ihmisten kannalta.

Päätelmät

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145–191.

4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

5) Tämän liitteen luku B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä)

6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

8) Tämän liitteen luku B.8 (Subakuutti myrkyllisyys hengitettynä: 28 päivän tutkimus)

9) Tämän liitteen luku B.29 (Subkrooninen myrkyllisyys hengitettynä: 90 päivän tutkimus)

10) Tämän liitteen luku B.9 (Toistetun annoksen (28 päivää) myrkyllisyys (ihon kautta nautittavat aineet))

11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

▼M4

14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

19) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta, EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33.

20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15–23.

24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60,

25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691–704.

27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

▼**M4**

30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam.&Appl. Toxicol. 29: 198–201.

31) EMEA (draft) document ”Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity” (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼B

B.31. **PRENATAALISEN KEHITYKSEN AIKAISTEN MYRKYLLISYYSVAIKUTUSTEN TUTKIMUS**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 414 (2001).

1.1 JOHDANTO

Tämän sikiönkehityksen aikaisten myrkyllisyysvaikutusten testimenetelmän tarkoitus on hankkia yleistä tietoa syntymää edeltävän altistuksen vaikutuksista tiineeseen koe-eläimeen ja sen kohdussa kehittyvään organismiin. Testiin voi sisältyä emoon kohdistuvien vaikutusten arviointi sekä sikiön kuoleman, rakenteellisten epämuodostumien tai poikkeavan kehityksen arviointi. Sikiön toiminnallisia häiriöitä, jotka ovat tärkeä osa kehitystä, ei tutkita tässä menetelmässä. Niitä voidaan tutkia erillisellä testillä tai tämän testin ohessa käyttämällä hermostonkehitykseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia selvittävää menetelmää. Toiminnallisten häiriöiden ja muiden syntymän jälkeisten vaikutusten testauksesta saa tietoa kahden sukupolven reproduktiivisten myrkyllisyysvaikutusten tutkimusmenetelmästä sekä hermostonkehitykseen kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten menetelmästä soveltuvin osin.

Tätä testimenetelmää voidaan joutua mukauttamaan yksittäistapauksissa testiaineen fysikokemiallisten tai toksikologisten ominaisuuksien mukaan. Mukauttaminen on hyväksyttävää, jos on olemassa vakuuttavaa tieteellistä viitettä, että testi olisi siten informatiivisempi. Jos testiä mukautetaan, on mainittu tieteellinen näyttö dokumentoitava huolellisesti tutkimusraportissa.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kehitystoksikologia: tieteenala, joka tutkii kehittyvässä organismissa esiintyviä haittavaikutuksia, jotka voivat aiheutua altistuksesta ennen hedelmöitymistä, syntymää edeltävän kehityksen aikana tai syntymän jälkeisenä aikana sukukypsyysikään asti. Sikiönkehityksen aikaisten myrkyllisyysvaikutusten tärkeimmät ilmenemismuodot ovat 1) organismin kuolema 2) rakenteelliset epämuodostumat 3) poikkeava kasvu sekä 4) toiminnalliset häiriöt. Aikaisemmin kehitystoksikologiaa kutsuttiin usein teratologiaksi.

Haittavaikutus: sellainen käsittelyyn liittyvä poikkeama perustasosta, joka vähentää organismin kykyä pysyä hengissä, lisääntyä tai sopeutua ympäristöön. Kehitystoksikologian kannalta haittavaikutus on laajimmassa merkityksessään mikä tahansa vaikutus, joka haittaa conceptuksen normaalia kehitystä sekä ennen syntymää että syntymän jälkeen.

Poikkeava kehitys: poikkeama poikasen elinten tai ruumiin painossa tai koossa.

Poikkeamat (epämuodostumat): kehityksessä ilmenevät rakenteelliset poikkeamat, joihin sisältyvät sekä epämuodostumat että vaihtelu (28).

Epämuodostuma / merkittävä epänormaalius: rakenteellinen muutos, joka katsotaan eläimelle haitalliseksi (voi olla myös letaali) ja jota esiintyy harvoin.

▼B

Vaihtelu / vähäinen epänormaalius: rakenteellinen muutos, joka katsotaan eläimelle vähän tai ei lainkaan haitalliseksi. Muutos voi olla ohimenevä ja esiintyä suhteellisen usein vertailupopulaatiossa.

Hedelmöitymisen tulos (conceptus): kaikki hedelmöityneestä munasolusta kehittyneet kudokset kaikissa kehitysvaiheissa hedelmöitymisestä syntymään asti. Sisältää alkion tai sikiön sekä sikiökalvot ja istukan.

Implantaatio: blastokystan kiinnittyminen kohdun epiteeliin, mukaan lukien tunkeutuminen epiteelin läpi ja kiinnittyminen endometriumiin.

Alkio: organismin varhais- tai kehitysvaihe, erityisesti munasolun hedelmöitymisen tuote pituusakselin ilmaantumisen jälkeen siihen saakka, kunnes keskeiset rakenteet ovat kehittyneet.

Alkioon kohdistuva myrkyllisyysvaikutus: alkion normaalia rakennetta, kehitystä, kasvua ja/tai elinkelpoisuutta haittaava vaikutus.

Sikiö: syntymätön organismi alkiokehityksen jälkeen.

Sikiöön kohdistuva myrkyllisyysvaikutus: sikiön normaalia rakennetta, kehitystä, kasvua ja/tai elinkelpoisuutta haittaava vaikutus.

Tiineyden keskeytyminen (abortoituminen): hedelmöitymisen tulosten (alkion tai elinkelvottoman sikiön) ennenaikainen poistuminen kohdusta.

Resorptio: implantaation jälkeen kuollut conceptus, joka resorboituu parhaillaan tai on jo resorboitunut.

Varhainen resorptio: todistettavasti tapahtunut implantaatio ilman tunnistettavaa alkiota tai sikiötä.

Myöhäinen resorptio: kuollut alkio tai sikiö, jossa näkyy ulkoisia degeneratiivisia muutoksia.

NOAEL: lyhennys määritelmälle ”no-observed-adverse-effect level” (haitaton vaikutustaso). Korkein annos- tai altistustaso, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

1.3 VERTAILUAINE

Ei käytössä.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta annetaan tiineille eläimille ainakin implantaation ja eläimen suunnitellun lopettamisen välisenä aikana. Lopettaminen on tehtävä mahdollisimman lähellä normaalia synnytyspäivää välttäen kuitenkin sitä, että menetettäisiin tutkimustietoja ennenaikaisen synnytyksen johdosta. Testimenetelmän tarkoitus ei ole tutkia yksinomaan organogeneesin eli elinten muodostumisen jaksoa (jyrsijöillä päivät 5–15, kaniinilla päivät 6–18), vaan myös soveltuvissa tapauksissa koko tiineyden aikaisia vaikutuksia alkaen ennen implantaatiota ja päättyen sektiota edeltävään päivään. Hiukan ennen sektiota naaraat lopetetaan, niiden kohdunsisältö tutkitaan ja sikiöistä tutkitaan ulkoiset näkyvät epämuodostumat sekä pehmytkudosten ja luuston muutokset.

▼B

1.5 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1 **Eläinlajin valinta**

Testissä suositellaan käytettäväksi parhaiten soveltuvaa eläinlajia sekä sellaisia laboratorioeläinlajeja ja -kantoja, joita käytetään yleisesti syntymää edeltävien myrkyllisyysvaikutusten tutkimuksessa. Jyrsijöistä suositeltava koe-eläin on rotta ja muista eläimistä kaniini. Muiden lajien käyttö on erikseen perusteltava.

1.5.2 **Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta**

Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla jyrsijöillä 22 ºC (+ 3º) ja kaniineilla 18 ºC (+ 3º). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 % eikä mielellään ylitä 70 %:a muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Pariutumisen tulee tapahtua tarkoitukseen sopivissa häkeissä. Pariutumisen jälkeen on suositeltavaa pitää kukin eläin omassa häkissään, mutta myös muutaman eläimen pitäminen samassa häkissä on hyväksyttävää.

1.5.3 **Eläinten valmistelu**

Testissä tulee käyttää terveitä eläimiä, jotka on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden vuorokauden ajan ja joita ei ole aiemmin käytetty testeihin. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja/tai ikä on tunnettava. Eläinten tulee kaikissa testiryhmissä olla samanpainoisia ja -ikäisiä niin tarkasti kuin on käytännössä mahdollista. Kullakin annostasolla tulee käyttää nuoria täysikasvuisia naaraita, jotka eivät ole synnyttäneet. Naaraat tulee parittaa saman lajin ja kannan urosten kanssa, ja sisarusten pariutumista tulee välttää. Jyrsijöillä tiineyden alkupäivä (päivä 0) on se, jolloin vaginan tulpitus ja/tai sperma havaitaan; kaniineilla se on yleensä pariutumisen tai keinosiemennyksen päivä, mikäli keinosiemennystä käytetään. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Kullekin eläimelle annetaan oma tunnistenumero. Paritetut naaraat jaetaan satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmään, ja jos naaraat on paritettu erissä, kunkin erän eläimet tulee jakaa tasaisesti molempiin ryhmiin. Samoin on meneteltävä saman uroksen hedelmöittämien naaraiden kohdalla.

1.6 TESTIN SUORITUS

1.6.1 **Eläinten määrä ja sukupuoli**

Kussakin testi- ja kontrolliryhmässä tulee olla niin paljon naaraita, että ruumiinavaukseen saadaan noin 20 eläintä, joilla implantaatio voidaan havaita. Ryhmät, joissa tällaisia eläimiä on vähemmän kuin 16, eivät mahdollisesti ole asianmukaisia. Emojen kuolleisuus ei välttämättä heikennä tutkimuksen validiteettia, mikäli kuolleisuus ei ylitä keskimäärin 10 %:a.

▼B

1.6.2 **Annosten valmistelu**

Jos annostelun helpottamiseksi käytetään kantaja-ainetta tai muuta lisäainetta, on syytä selvittää sen vaikutus testiaineen absorboitumiseen ja jakautumiseen, testiaineen metaboloitumiseen, elimistössä säilymiseen ja erityksseen. Lisäksi on selvitettävä sellaiset vaikutukset testiaineen kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka saattavat muuttaa testiaineen myrkyllisyyttä, sekä vaikutukset koe-eläinten ravinnon ja juoman nauttimiseen tai ravitsemustilaan. Kantaja-aineella ei saa olla sikiönkehitykseen tai lisääntymiseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia.

1.6.3 **Annostasot**

Normaalisti testiainetta annetaan päivittäin alkaen implantaatiosta (esim. päivä 5 pariutumisen jälkeen) suunniteltua sektiota edeltävään päivään asti. Jos aikaisemmat tutkimukset, mikäli sellaisia on tehty, eivät osoita merkittävää ennen implantaatiota tapahtuvan alkionmenetyksen mahdollisuutta, ainetta voidaan antaa koko tiineyden ajan parittelusta eläimen suunniteltua lopettamista edeltävään päivään. Eläimen virheellinen käsittely tai tiineyden aikainen stressi voivat johtaa sikiön menetykseen. Jotta sikiön menetys muista kuin testiin liittyvistä syistä estettäisiin, tiineiden eläinten tarpeetonta käsittelyä sekä ulkoisten tekijöiden kuten melun aiheuttamaa stressiä tulee välttää.

Testissä tulee käyttää vähintään kolmea annostasoa ja testin kanssa samaan aikaan tehtäviä kontrolleja. Terveet eläimet jaetaan satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmään. Annostasojen välit määritetään siten, että toksiset vaikutukset saadaan porrastettua. Jos testiaineen fysikaalinen/kemiallinen olomuoto tai biologiset ominaisuudet eivät aseta rajoituksia, suurin annos määritetään sellaiseksi, että se on jonkin verran myrkyllinen kehittyvälle sikiölle ja/tai emolle (kliinisiä löydöksiä tai ruumiinpainon väheneminen), mutta ei aiheuta kuolemaa tai kovia tuskia. Ainakin yksi suurimman ja pienimmän välillä oleva annostaso asetetaan sellaiseksi, että se aiheuttaa erittäin pienen havaittavan myrkyllisyysvaikutuksen. Pienin annos asetetaan sellaiseksi, että sillä ei ole mitään myrkyllisyysvaikutuksia kehittyvään sikiöön tai emoon. Annostasot on porrastettava siten, että tutkimuksessa saadaan esiin mahdolliset annostasoihin liittyvät reaktiot sekä haitaton altistustaso (NOAEL). Kaksinkertaiset–nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi yli 10-kertaisia annosvälejä). Vaikka tavoitteena onkin määrittää emon haitaton altistustaso, hyväksyttäviä voivat olla myös tutkimukset, joissa tällaista tasoa ei määritetä (1).

Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon aikaisemmat myrkyllisyystiedot sekä tiedot testiaineen tai muiden sen kanssa samantyyppisten materiaalien metaboloitumisesta elimistössä samoin kuin niiden toksikokineettisistä ominaisuuksista. Nämä tiedot auttavat myös osoittamaan, että annostasot on valittu oikein.

Testissä on käytettävä samanaikaista kontrolliryhmää. Sen tulee olla joko plaseboa saava kontrolliryhmä tai kantaja-ainetta saava kontrolliryhmä, mikäli testiaineen antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Kaikille ryhmille annetaan tilavuudeltaan sama määrä joko testi- tai kantaja-ainetta. Kontrolliryhmän tai -ryhmien eläimiä tulee käsitellä samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä. Kantaja-aineen kontrolliryhmille tulee antaa suurin käytetty määrä kantaja-ainetta (kuten alimmassa testiryhmässä).

▼B

1.6.4 **Raja-annostesti**

Jos jokin testin annostaso, joka on vähintään 1 000 mg/kg (eläimen painokilo)/vrk ja joka annetaan suun kautta tässä testimenetelmässä kuvattujen menettelyjen mukaisesti, ei aiheuta lainkaan havaittavaa myrkyllisyysvaikututusta tiineissä eläimissä tai niiden jälkeläisissä ja jos myrkyllisyysvaikutusta ei aikaisempien tutkimustulosten perusteella ole odotettavissa (esimerkiksi rakenteellisesti ja/tai metabolisesti samantyyppiset yhdisteet), täydellinen kolmea annostasoa käyttävä testi ei välttämättä ole tarpeen. Jos odotettavissa on ihmisten altistuminen aineelle, voi olla tarpeen käyttää raja-annostestissä suurempaa annostasoa, kun aine annetaan suun kautta. Muita antotapoja kuten inhalaatiota tai ihoapplikaatiota käytettäessä testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet saattavat usein osoittaa altistuksen enimmäistason (esimerkiksi ihoapplikaatio ei saa aiheuttaa vakavaa paikallista myrkyllisyysvaikutusta).

1.6.5 **Antotapa**

Testiaine tai kantaja-aine annetaan yleensä suun kautta letkulla. Jos käytetään muuta antotapaa, testin tekijän on perusteltava sen käyttö ja muutettava muita kohtia vastaavasti (2) (3) (4). Testiaine annetaan päivittäin suunnilleen samaan aikaan.

Kunkin eläinyksilön annoksen tulee yleensä perustua viimeiseen eläimen ruumiin painon määritykseen. Annoskoon määrittämisessä on kuitenkin oltava erityisen huolellinen viimeisen tiineyskolmanneksen aikana. Aikaisempien tutkimustietojen perusteella on valittava sellainen annoskoko, joka ei aiheuta liikaa myrkyllisyysvaikutuksia emolle. Jos kuitenkin havaitaan liian suuria myrkyllisyysvaikutuksia testiainetta saaneissa emoissa, nämä eläimet on lopetettava inhimillisellä tavalla. Jos useissa tiineissä eläimissä havaitaan liian suuren myrkyllisyysvaikutuksen merkkejä, on syytä harkita koko kyseisen annostasoryhmän lopettamista. Letkuruokinnassa aine on annettava eläimelle yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Suurin kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Nestemäärän tilavuus ei saa ylittää 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Kun kantaja-aineena on maissiöljy, tilavuus ei saa olla suurempi kuin 0,4 ml/100 g painoa. Testiaineen nestemäärän tilavuusvaihtelu tulee minimoida pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla voidaan käyttää tilavuudeltaan samaa nestemäärää.

1.6.6 **Emojen havainnointi**

Kliinisiä havaintoja tulee tehdä ja kirjata ainakin kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Eläinten kliinisestä tilasta kirjataan kuolleisuus, kuoleman lähestyminen, testiin liittyvät käytösmuutokset ja kaikki ilmeisten myrkyllisyysvaikutusten merkit.

1.6.7 **Eläimen paino ja ravinnon nauttiminen**

Eläimet punnitaan tiineyden päivänä 0 (tai viimeistään päivänä 3, jos käytetään ulkopuolisen kasvattajan toimittamia aikaparitettuja eläimiä), ensimmäisen annoksen antopäivänä, vähintään joka kolmas päivä annosten antamisjaksolla sekä eläinten suunniteltuna lopettamispäivänä.

▼B

Ravinnonotto kirjataan kolmen päivän välein ruumiinpainon määrityspäivinä.

1.6.8 **Post mortem -tutkimus**

Naaraat lopetetaan päivää ennen odotettua synnytyspäivää. Naaraat, joissa havaitaan tiineyden keskeytymisen tai ennenaikaisen synnytyksen merkkejä ennen suunniteltua lopetuspäivää, on lopetettava, ja niille on tehtävä perusteellinen makroskooppinen tutkimus.

Kun naaras lopetetaan tai kun se kuolee testin aikana, siitä on makroskooppisesti tutkittava mahdolliset rakenteelliset epämuodostumat tai patologiset muutokset. Systemaattisen virheen minimoimiseksi naaraiden arviointi sektion aikana ja sitä seuraavat sikiöanalyysit tulisi tehdä tietämättä, mihin ryhmään kyseinen naaras kuuluu.

1.6.9 **Kohdunsisällön tutkiminen**

Välittömästi eläimen lopettamisen jälkeen tai mahdollisimman pian kuoleman jälkeen kohtu poistetaan ja tiineys varmistetaan. Kohdut, joissa ei ole näkyviä tiineyden merkkejä, on tutkittava tarkemmin (jyrsijät esimerkiksi ammoniumsulfidivärjäyksellä ja kaniinit Salewski-värjäyksellä tai vastaavalla menetelmällä) asian varmistamiseksi (5).

Tiineiden eläinten kohdut punnitaan, mukaan lukien kohdunkaula. Jos eläimet ovat kuolleet testin aikana, kohtuja ei punnita.

Tiineiden eläinten keltarauhasten määrä määritetään.

Kuolleiden alkioiden tai sikiöiden määrä sekä elinkelpoisten sikiöiden määrä määritetään kohdunsisältöä tutkimalla. Resorptioaste kuvataan, jotta voidaan arvioida conceptuksen suhteellinen kuolinaika (katso kohta 1.2).

1.6.10 **Sikiöiden tutkiminen**

Kunkin sikiön sukupuoli ja ruumiinpaino määritetään.

Kustakin sikiöstä tutkitaan ulkoiset muutokset (6).

Sikiöistä tutkitaan luuston ja pehmytkudosten muutokset (esimerkiksi vaihtelut ja epämuodostumat) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Sikiömuutosten luokittelu on suositeltavaa, mutta ei pakollista. Jos luokitus tehdään, on kunkin luokan määrityskriteerit esitettävä selvästi. Erityistä huomiota on kiinnitettävä lisääntymiselimiin, joista tutkitaan poikkeavan kehityksen merkit.

Kustakin jyrsijäpoikueesta noin puolet preparoidaan luustomuutosten tutkimista varten ja tutkitaan. Toinen puoli preparoidaan pehmytkudosmuutosten tutkimista varten ja tutkitaan käyttäen hyväksyttyjä tai soveltuvia mikrotomiamenetelmiä tai huolellista dissektiomenetelmää.

▼B

Muiden eläinten kuin jyrsijöiden, esimerkiksi kaniinien, poikueista tutkitaan kaikilta sikiöiltä sekä pehmytkudos- että luustomuutokset. Näiden sikiöiden ruumiista tutkitaan pehmytkudosmuutokset huolellisen dissektion avulla. Tähän voi liittyä jatkotoimia sydämen sisäisten rakenteiden (25) arvioimiseksi. Puolelta näin tutkituista sikiöistä irrotetaan päät, joiden pehmytkudosmuutokset (muun muassa silmät, aivot, nenäontelot ja kieli) tutkitaan käyttäen tavanomaisia sarjaleikemenetelmiä (26) tai muita yhtä herkkiä menetelmiä. Näiden sikiöiden vartalo-osat sekä muut sikiöt, joita ei ole tutkittu, preparoidaan luustomuutosten tutkimista varten ja tutkitaan samoilla menetelmillä kuin jyrsijät.

2. MÄÄRITYSTULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tiedot raportoidaan erikseen kustakin emosta ja sen jälkeläisistä ja esitetään taulukossa, jossa on eritelty testiryhmittäin eläinten määrä testin alussa, testin aikana kuolleiden tai inhimillisistä syistä lopetettujen eläinten määrä, kuoleman tai lopettamisen aika, tiineiden naaraiden määrä, niiden eläinten määrä, joissa myrkyllisyysvaikutuksia on havaittavissa, kuvaus havaituista myrkyllisyysvaikutuksista mukaan lukien myrkytysoireiden alkamisaika, kesto ja vakavuus, alkiosta tai sikiöstä tehtyjen havaintojen laji sekä kaikki asiaankuuluvat tiedot poikueesta.

Numeeriset tulokset arvioidaan sopivalla tilastollisella menetelmällä käyttäen poikuetta analyysin yksikkönä. Tilastollisen menetelmän on oltava yleisesti hyväksytty, se on valittava tutkimusta suunniteltaessa ja sen valinta on perusteltava. Myös sellaisten eläinten tiedot, jotka kuolevat ennen niiden suunniteltua lopettamista, on raportoitava. Nämä tiedot voidaan sisällyttää ryhmäkeskiarvoihin, mikäli se on perusteltua. Tällaisista eläimistä saatujen tietojen relevanssi ja niin muodoin näiden tietojen sisällyttäminen ryhmäkeskiarvoihin tai jättäminen niistä pois tulee perustella ja arvioida tapauskohtaisesti.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI

Syntymää edeltävien kehitysmyrkyllisyysvaikutusten testin löydökset arvioidaan tarkastelemalla havaittuja vaikutuksia. Arviointiin tulee sisältyä seuraavat tiedot:

— emon ja alkion/sikiön testitulokset sekä eläinten testiainealtistuksen ja toisaalta kaikkien löydösten esiintyvyyden ja vakavuuden välisen mahdollisen suhteen arvioiminen

— sikiön ulkoisten muutosten sekä pehmytkudos- ja luustomuutosten luokittelussa käytetyt kriteerit, jos luokittelua on käytetty

▼B

— soveltuvissa tapauksissa historiallinen kontrolliaineisto, joka tehostaa tutkimustulosten tulkintaa

— kaikkien prosenttiosuuksien tai indeksien laskennassa käytetyt luvut

— soveltuvissa tapauksissa tutkimustulosten asianmukainen tilastollinen analyysi, joka sisältää analyysimenetelmästä sellaiset tiedot, että riippumaton arvioija/tilastoasiantuntija voi niiden avulla arvioida ja rekonstruoida analyysin.

Jos kehitykseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia ei voida osoittaa, on syytä harkita jatkoselvitystä, jossa määritetään absorptio ja testiaineen hyötyosuus.

2.3 TULOSTEN TULKINTA

Syntymää edeltävien myrkyllisyysvaikutusten tutkimuksen tulee antaa tietoja toistuvan tiineydenaikaisen testiainealtistuksen vaikutuksista emoihin sekä niiden jälkeläisten kohdunsisäiseen kehitykseen. Tutkimuksen tulokset on tulkittava yhdessä subkroonisten, lisääntymisfysiologisten, toksikokineettisten ja muiden tutkimusten kanssa. Koska tutkimuksessa painotetaan sekä yleisiä myrkyllisyysvaikutuksia (emoon kohdistuvat vaikutukset) että sikiön kehitykseen vaikuttavien myrkyllisyysvaikutusten loppupisteitä, tutkimustulosten perusteella voidaan jossain määrin erotella toisaalta ne sikiön kehitykseen kohdistuvat vaikutukset, jotka esiintyvät yleisten myrkyllisyysvaikutusten puuttuessa, sekä toisaalta ne vaikutukset, jotka esiintyvät vain sellaisilla annostasoilla, jotka ovat myrkyllisiä myös emolle (27).

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikokemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot mukaan lukien CAS-numero, jos tiedossa/käytössä

— puhtaus.

Kantaja-aine (tarvittaessa)

— jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

Koe-eläinlajit

— käytetty eläinlaji ja kanta

— eläinten lukumäärä ja ikä

— toimittaja, häkit, ravinto ja niin edelleen

— kunkin eläimen paino testin alussa.

Testiolosuhteet:

— annostasojen valintaperusteet

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta/ravintovalmisteesta, testiaineen saavutettu pitoisuus, stabiilisuus ja tasalaatuisuus valmisteessa

▼B

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen antotavasta

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk) ja muuntokerroin ravintoon/-juomaveteen sekoitetun testiaineen pitoisuudelle (ppm) tarvittaessa

— ympäristöolosuhteet

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta.

Tulokset:

Ainakin seuraavat tiedot emon vasteesta myrkylliseen aineeseen:

— eläinten määrä testin alussa, testin lopussa elossa olevien eläinten määrä, tiineiden eläinten määrä, niiden eläinten määrä, joiden tiineys keskeytyi, sekä ennenaikaisesti synnyttäneiden eläinten määrä

— kuolinpäivä testin aikana tai tieto eläimen selviämisestä suunniteltuun lopettamiseen asti

— ennen suunniteltua lopettamista kuolleiden eläinten tiedot kirjataan, mutta niitä ei oteta mukaan ryhmien väliseen tilastolliseen vertailuun

— jokaisen poikkeavan kliinisen löydöksen havaintopäivä ja sen jatkokehitys

— ruumiinpaino, painon muutos ja tiineen eläimen kohdun paino; haluttaessa myös ruumiinpainon muutos korjattuna kohdun painolla

— ravinnonotto sekä nautitun veden määrä, mikäli se on mitattu

— ruumiinavauslöydökset, mukaan lukien kohdun paino

— haitattoman annostason arvot emolle ja kehittyvälle sikiölle.

Kehitykseen liittyvät loppupisteet annostasoittain poikueille, joissa on implantaatioita, mukaan lukien seuraavat tiedot:

— keltarauhasten määrä

— implantaatioiden määrä, elävien ja kuolleiden sikiöiden sekä resorptiotapausten määrä ja prosenttiosuus

— ennen ja jälkeen implantaation tapahtuneiden tiineyden keskeytymisten määrä ja prosenttiosuus.

Kehitykseen liittyvät loppupisteet annostasoittain poikueille, joissa on eläviä sikiöitä, mukaan lukien seuraavat tiedot:

— elävien poikasten määrä ja prosenttiosuus

— sukupuolten välinen suhde

— sikiön ruumiinpaino, mielellään sekä sukupuolen mukaan että molemmille sukupuolille

— ulkoiset epämuodostumat, pehmytkudosten ja luuston epämuodostumat ja muut merkittävät muutokset

— luokittelukriteerit tarvittaessa

▼B

— niiden sikiöiden ja poikueiden kokonais- ja prosenttimäärä, joilla on ulkoisia muutoksia tai pehmytkudosten tai luuston muutoksia, sekä yksittäisten epämuodostumien ja muutosten laji ja esiintyvyys.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **LÄHDELUETTELO**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399–410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386–398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1–8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171–173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; :381–391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229–242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291–306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313–320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; :398–408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309–316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169–181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* pp. 163–173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411–445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61–63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313–355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181–188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251–277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233–239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37–38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126–144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798–63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249–292.

▼M4

B.32 **KARSINOGEENISUUSTUTKIMUKSET**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 451 (2009). Alkuperäinen karsinogeenisuustestejä koskeva testiohje nro 451 hyväksyttiin vuonna 1981. Tämän tarkistetun testimenetelmän B.32 kehittäminen katsottiin tarpeelliseksi, jotta siinä voidaan ottaa huomioon eläinten hyvinvointiin ja sääntelyvaatimuksiin liittyvä viimeaikainen kehitys (2) (3) (4) (5) (6). Tämän testimenetelmän B.32 ajantasaistus on toteutettu yhdessä tässä liitteessä olevan luvun B.30 (Krooninen myrkyllisyystesti) ja luvun B.33 (Yhdistetty krooninen myrkyllisyys/karsinogeenisuustesti) tarkistusten kanssa. Tavoitteena on saada lisää tietoa tutkimuksessa käytetyistä eläimistä ja yksityiskohtaisempaa tietoa annoksen valinnasta. Tämä testimenetelmä B.32 on tarkoitettu käytettäväksi monien erilaisten kemikaalien, torjunta-aineiden ja teollisuuskemikaalien testauksessa. Todettakoon kuitenkin, että jotkin yksityiskohdat ja vaatimukset saattavat erota lääkkeitä koskevista vaatimuksista (katso kansainvälisen harmonisointikonferenssin (ICH:n) ohje S1B lääkkeiden karsinogeenisuuden testauksesta).

2. Koska valtaosa karsinogeenisuustesteistä tehdään jyrsijälajeilla, tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi ensisijaisesti tutkimuksissa, jotka tehdään näillä lajeilla. Jos tällaisia tutkimuksia on tehtävä muilla kuin jyrsijöillä, on noudatettava tässä testimenetelmässä esitettyjä sekä tässä liitteessä olevan luvun B.27 (Toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) (6) mukaisia periaatteita ja menettelyjä asianmukaisin muutoksin. Lisää ohjeita on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelua ja toteuttamista (7).

3. Karsinogeenisuustutkimuksissa käytettävät kolme pääasiallista antoreittiä ovat suun kautta, ihon kautta ja hengitysteiden kautta. Antoreitti valitaan testattavan kemikaalin fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä ihmisten todennäköisen altistumisreitin mukaan. Lisätietoja altistusreitin valinnasta on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

4. Tässä testimenetelmässä keskitytään suun kautta altistukseen, koska se on yleisimmin käytetty altistustapa karsinogeenisuustutkimuksissa. Vaikka karsinogeenisuustutkimukset, joihin sisältyy ihon tai hengitysteiden kautta altistus, voivat olla tarpeen ihmisten terveysriskien arvioinnissa ja/tai vaikka niitä voidaan tarvita tiettyjen sääntelyohjelmien nojalla, molemmat altistusreitit ovat teknisesti erittäin monimutkaisia. Tällaiset tutkimukset on suunniteltava tapauskohtaisesti, joskin tässä kuvattu testimenetelmä, joka on tarkoitettu suun kautta altistuksesta aiheutuvan karsinogeenisuuden määrittämiseen ja arviointiin, voi olla pohjana hengitysteiden ja/tai ihon kautta tapahtuvaa altistusta koskeville tutkimuksille käsittelyaikoja sekä kliinisiä ja patologisia parametreja jne. koskevien suositusten osalta. Saatavilla on OECD:n ohje testikemikaalien annostelusta ihon (7) ja hengitysteiden (7) (8) kautta. Kun suunnitellaan pitempiaikaisia tutkimuksia, joihin liittyy altistus hengitysteiden kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9) sekä OECD:n ohjeasiakirjaa (8), joka koskee altistusta hengitysteiden kautta. Kun altistustestaus toteutetaan ihon kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.9 (11).

▼M4

5. Karsinogeenisuustutkimuksesta saadaan tietoja mahdollisista terveyshaitoista, joita toistuvasta altistuksesta todennäköisesti seuraa ja jotka kestävät jopa käytettyjen lajien koko eliniän ajan. Tutkimuksesta saadaan tietoa testikemikaalin myrkyllisistä vaikutuksista ja mahdollisesta karsinogeenisuudesta, ja sen avulla saatetaan tunnistaa kohde-elimet ja kemikaalin mahdollinen kertyminen. Lisäksi tutkimuksesta voidaan saada arvio tasosta, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL). Ei-genotoksisten karsinogeenien osalta voidaan määrittää kasvainvasteet, joita voidaan käyttää laadittaessa turvallisuuskriteereitä ihmisten altistumiselle. Korostettakoon, että eläinten huolellinen kliininen tarkkailu on hyvin tärkeää, jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa.

6. Tämän testimenetelmän kattamien karsinogeenisuustutkimusten tavoitteet ovat seuraavat:

— Testikemikaalin sellaisten karsinogeenisten ominaisuuksien tunnistaminen, jotka lisäävät kasvainten ilmaantuvuutta tai pahanlaatuisten kasvainten määrää tai vähentävät kasvainten syntymiseen kuluvaa aikaa verrattuna samanaikaisiin vertailuryhmiin.

— Karsinogeenisuuden kohde-elimen (-elinten) tunnistaminen.

— Kasvainten ilmaantumiseen kuluvan ajan määrittäminen

— Kasvaimen annos-vastesuhteen luonnehtiminen.

— NOAEL-arvon (taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta) määrittäminen tai viiteannoksen (BMD:n) määrittämisen lähtökohta.

— Karsinogeenisten vaikutusten ekstrapolointi ihmisten altistumistasoihin pienillä annoksilla.

— Tiedon tuottaminen vaikutustapaa koskevia testihypoteeseja varten (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Kun määritetään ja arvioidaan testikemikaalin karsinogeenisia ominaisuuksia, testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista, jotta tutkimus voidaan suunnitella siten, että mahdollista karsinogeenisuutta voidaan testata tehokkaasti ja jotta eläinten käyttö voidaan pitää mahdollisimman vähäisenä. Epäillyn karsinogeenin vaikutustapaa koskevat tiedot ja niiden ottaminen huomioon (2) (7) (12) (13) (14) (15) on erittäin tärkeää, koska paras tutkimusmenetelmä voi vaihdella sen mukaan, tiedetäänkö vai epäilläänkö testikemikaalin olevan genotoksinen karsinogeeni. Lisätietoa vaikutustapaa koskevista huomioista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

8. Tietoihin, joista on apua tutkimuksen suunnittelussa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien ja genotoksisuustestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (odotettavissa olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot, mutageenisuus/genotoksisuustiedot, karsinogeenisuustiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista, saatavilla olevat toksikokineettiset tiedot (kerta-annoksen ja myös toistuvan annoksen kinetiikka, jos saatavilla) sekä muista toistuvaa altistusta käsitelleistä tutkimuksista saadut tiedot. Karsinogeenisuus on määritettävä vasta sitten, kun myrkyllisyydestä on saatu

▼M4

alustavia tietoja toistetuilla annoksilla suoritetuista 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystesteistä. Lyhytaikaiset testit, joissa tutkitaan syövän puhkeamista ja etenemistä, voivat antaa myös hyödyllistä tietoa. Karsinogeenisuustestauksen osalta on harkittava vaiheittaista testaustapaa osana tietyn testikemikaalin mahdollisten terveyteen kohdistuvien haitallisten vaikutusten kokonaisarviointia (16) (17) (18) (19).

9. Ennen tutkimuksen aloittamista on määritettävä tulosten analysointiin sopivimmat tilastomenetelmät koejärjestelyt ja tavoitteet huomioon ottaen. On pohdittava sitä, onko tilastoihin sisällytettävä eloonjäämistä koskeva korjaus, kumulatiivisten kasvainriskien analyysi suhteessa eloonjäämisen pituuteen, kasvaimen ilmaantumiseen kuluvaa aikaa koskeva analyysi sekä analyysi, joka on tehtävä, jos testi keskeytyy yhdessä tai useammassa ryhmässä ennenaikaisesti. Asianmukaisia tilastollisia analyyseja koskevia ohjeita sekä keskeiset viitetiedot kansainvälisesti hyväksytyistä tilastomenetelmistä on ohjeasiakirjassa GD 116 (7) sekä ohjeasiakirjassa GD 35, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten analyysia ja arviointia (20).

10. Karsinogeenisuustutkimuksia tehtäessä on noudatettava aina periaatteita ja näkökohtia, jotka on määritelty OECD:n ohjeasiakirjassa nro 19 (turvallisuuden arvioinneissa käytetyillä koe-eläimillä ilmenevien kliinisten merkkien tunnistaminen, arvioiminen ja käyttäminen humaaneina lopettamiskriteereinä) (21) ja eritoten sen 62 kohdassa. Kyseisessä kohdassa todetaan näin: ”Kun tutkimuksissa, joihin sisältyy toistuvaa annostelua, eläin osoittaa sellaisia kliinisiä merkkejä, jotka ovat progressiivisia ja jotka johtavat eläimen tilan huonontumiseen, on tehtävä tietoon perustuva päätös siitä, tuleeko eläin lopettaa humaaneista syistä. Päätöstä tehtäessä on otettava huomioon, mitä tutkimuksellista arvoa eläimen hengissä pitämisen jatkamisesta saatavalla tiedolla on suhteessa sen yleistilaan. Jos eläin päätetään pitää testissä edelleen, havaintoja on tehtävä tiheämmin, mikäli tarpeen. On myös mahdollista keskeyttää annostus tai pienentää testiannosta väliaikaisesti, mikäli se lievittää tuskia tai kärsimyksiä, ilman että se haittaa testin tarkoitusta.”

11. Tarkempia ohjeita ja kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten annoksen valintaa ohjaavia periaatteita on ohjeasiakirjassa GD 116 (7) sekä kahdessa International Life Sciences Instituten julkaisussa (22) (23). Keskeinen annoksen valintastrategia määräytyy tutkimuksen ensisijaisen tavoitteen tai ensisijaisten tavoitteiden mukaisesti (6 kohta). Asianmukaisia annostasoja valittaessa on pyrittävä saavuttamaan tasapaino yhtäältä vaarojen seulonnan ja toisaalta pieniin annoksiin liittyvien vasteiden ja niiden merkityksen välillä. Tämä on oleellista varsinkin tilanteessa, kun on määrä toteuttaa yhdistetty kroonista myrkyllisyyttä ja karsinogeenisuutta koskeva tutkimus (tämän liitteen luku B.33) (12 kohta).

12. Erillisen kroonisen myrkyllisyystutkimuksen (tämän liitteen luku B.30) ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.32) sijasta on harkittava yhdistetyn kroonisen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.33) toteuttamista. Kahteen erilliseen tutkimukseen verrattuna yhdistetty tutkimus on ajan ja kustannusten kannalta tehokkaampi, mutta tietojen laatu ei vaarannu kroonisessa vaiheessa tai karsinogeenisuutta käsittelevässä vaiheessa. Kun tehdään yhdistetty krooninen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimus (tämän liitteen luku B.33), on kiinnitettävä erityistä huomiota annoksen valinnan periaatteisiin (11 ja 22–25 kohta). Todettakoon, että tiettyjen sääntelypuitteiden nojalla voidaan edellyttää erillisiä tutkimuksia.

▼M4

13. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät on esitetty tämän kohdan lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

TESTIN PERIAATE

14. Testikemikaalia annostellaan päivittäin erisuuruisina annoksina useille koe-eläinryhmille suurimman osan niiden elinajasta yleensä suun kautta. Testaus voi olla tarkoituksenmukaista myös hengitysteiden tai ihon kautta. Eläimiä havainnoidaan tarkasti myrkyllisyyden merkkien ja neoplastisten leesioiden kehittymisen havaitsemiseksi. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

15. Tämä testimenetelmä koskee ensisijaisesti jyrsijöillä ilmenevän karsinogeenisuuden määrittämistä ja arviointia (katso 2 kohta). Muiden lajien kuin jyrsijöiden käyttöä voidaan harkita, kun saatavilla olevat tiedot viittaavat siihen, että muut lajit ovat oleellisempia ihmisten terveyteen kohdistuvien vaikutusten ennustamisessa. Lajin valinta on perusteltava. Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, mutta muitakin jyrsijöitä, esimerkiksi hiiriä, voidaan käyttää. Vaikka hiiren käyttämisestä karsinogeenisuustestauksessa koituva hyöty voi olla rajallinen (24) (25) (26), jotkin sääntelyohjelmat edellyttävät karsinogeenisuustestien tekemistä hiirellä, ellei päätetä, että tällainen tutkimus on tieteellisesti tarpeeton. Rottia ja hiiriä on käytetty ensisijaisina koe-eläiminä seuraavista syistä: niiden elinaika on suhteellisen lyhyt, niitä käytetään laajalti farmakologisissa ja toksikologisissa tutkimuksissa, niille muodostuu herkästi kasvaimia, ja saatavilla on kantoja, joita on luonnehdittu riittävästi. Tämän vuoksi niiden fysiologiasta ja patologiasta on saatavana paljon tietoa. Lisätietoja lajin ja kannan valinnasta on ohjeasiakirjassa nro 116 (7).

16. Testissä tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koe-eläinkantoja. Karsinogeenisuustutkimus on tehtävä mieluiten eläimillä, jotka ovat samaa kantaa ja samasta lähteestä kuin eläimet, joita käytettiin lyhyemmissä alustavissa myrkyllisyystutkimuksissa. Jos kyseisestä kannasta ja lähteestä peräisin olevien eläinten kuitenkin tiedetään aiheuttavan ongelmia pitkäaikaisissa tutkimuksissa yleensä käytettävien hyväksyttyjen eloonjäämiskriteerien täyttämisessä [katso ohjeasiakirja GD 116 (7)], on harkittava sellaisen eläinkannan käyttämistä, jonka eloonjäämisaste pitkäaikaisessa tutkimuksessa on hyväksyttävä. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

17. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Yksittäin pitämistä on harkittava vain, jos se on tieteellisesti perusteltua (27) (28) (29). Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, tulee kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion on vastattava kaikkia testattujen lajien ravintovaatimuksia. Ruokavalion sisältämien kontaminanttien

▼M4

määrän on oltava mahdollisimman pieni. Kontaminantteja, jotka saattavat vaikuttaa testin tuloksiin, ovat esimerkiksi torjunta-ainejäämät, pysyvät orgaaniset yhdisteet, fytoestrogeenit, raskasmetallit ja mykotoksiinit. Ravintoaine- ja kontaminanttipitoisuudesta on tuotettava analyyttista tietoa säännöllisesti, vähintään tutkimuksen alussa ja silloin, kun käytettävä erä muuttuu, ja nämä tiedot on sisällytettävä loppuraporttiin. Yhtä lailla on annettava analyyttista tietoa tutkimuksessa käytetystä juomavedestä. Ruokavalion valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa testikemikaalin ja eläinten ravintovaatimusten välinen tasapaino silloin, kun testikemikaalia annetaan ravintoon sekoitettuna.

Eläinten valmistelu

18. Testissä on käytettävä terveitä eläimiä, joita on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään seitsemän vuorokauden ajan ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Jyrsijöiden osalta testikemikaalin antaminen eläimille tulee aloittaa mahdollisimman pian vieroituksen ja totutuksen jälkeen, mielellään ennen kuin eläimet ovat kahdeksanviikkoisia. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja ikä on tunnettava. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun tulee olla mahdollisimman vähäistä, ja se saa vaihdella kummankin käytetyn sukupuolen osalta korkeintaan ± 20 prosenttia kaikkien tutkimuksessa käytettyjen eläinten keskimääräisestä painosta, joka on määritettävä kummallekin sukupuolelle erikseen. Eläimet tulee jakaa verrokki- ja testiryhmään satunnaistetusti. Satunnaistamisen jälkeen kummankaan sukupuolen ryhmissä ei saa olla suuria eroja keskimääräisessä painossa. Jos tilastollisesti merkitseviä eroja on, satunnaistamisvaihe on toistettava, mikäli mahdollista. Kullekin eläimelle tulee antaa oma tunnistenumero, joka on merkittävä eläimeen pysyvästi tatuoimalla, mikrosiruimplantilla tai muulla sopivalla tavalla.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

19. Testissä on käytettävä molempia sukupuolia. Testissä on käytettävä riittävää määrää eläimiä, jotta jokaisessa ryhmässä on tarpeeksi eläimiä tutkimuksen lopussa perusteellista biologista ja tilastollista arviointia varten. Sen vuoksi jokaisessa annosryhmässä ja samanaikaisessa verrokkiryhmässä on oltava vähintään 50 eläintä kumpaakin sukupuolta. Sen mukaan, mikä on tutkimuksen tavoite, keskeisten estimaattien tilastollista voimaa on mahdollista lisätä jakamalla eläimet eri annosryhmiin eri tavoin epätasaisesti siten, että pienen annoksen ryhmissä on yli 50 eläintä esimerkiksi sen vuoksi, että voidaan arvioida kemikaalin mahdollista karsinogeenisuutta pienillä annoksilla. On kuitenkin muistettava, että jos ryhmäkokoa kasvatetaan vain jonkin verran, tutkimuksen tilastollinen voima lisääntyy suhteellisen vähän. Lisätietoa tutkimuksen tilastollisesta suunnittelusta ja annostasojen valinnasta tilastollisen voiman maksimoimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

Eläinten lopettamista kesken tutkimuksen, satelliittiryhmiä ja erityisvalvonnassa olevia eläimiä koskeva säännös

20. Tutkimuksessa voidaan hyödyntää mahdollisuutta lopettaa eläimiä kesken tutkimuksen esimerkiksi 12 kuukauden kohdalla, jotta saadaan tietoa neoplastisten muutosten etenemisestä ja mekanistista tietoa, mikäli se on tieteellisesti perusteltua. Jos tällaisia tietoja on jo saatavana aiemmista samaa testikemikaalia koskevista toistetun annoksen myrkyllisyystutkimuksista, eläinten lopettaminen kesken tutkimuksen ei ole välttämättä tieteellisesti perusteltua. Jos tutkimussuunnitelmaan sisältyy kesken tutkimuksen tapahtuvia lopettamisia, kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten määrä jokaisessa annosryhmässä on yleensä 10 eläintä kumpaakin sukupuolta. Tutkimussuunnitelman mukaista eläinten kokonaismäärää on lisättävä ennen tutkimuksen päättymistä lopetettavaksi aiottujen eläinten määrällä. Lisäksi tutkimukseen voidaan sisällyttää ryhmä erityisvalvonnassa olevia eläimiä (yleensä viisi eläintä kumpaakin sukupuolta) sairauden tilan seuraamiseksi tutkimuksen aikana, mikäli tarpeen (30). Lisätietoja on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

▼M4

Annosryhmät ja annostus

21. Ohjeita kaikista annoksen valintaan ja annosten porrastamiseen liittyvistä näkökohdista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Tutkimuksessa on käytettävä vähintään kolmea annostasoa ja yhtä samanaikaista verrokkiryhmää. Annostasot perustuvat yleensä lyhyempien, toistetuilla annoksilla tehdyn testien tai annosalueen määritystestien tuloksiin, ja kaikki mahdolliset testikemikaalista tai samanlaisista kemikaaleista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon.

22. Mikäli testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso on yleensä valittava siten, että sen avulla voidaan tunnistaa ensisijaiset kohde-elimet ja myrkylliset vaikutukset ilman, että annos aiheuttaa kärsimystä, vakavaa myrkyllisyyttä, sairastuvuutta tai kuolemaa. Kun otetaan huomioon jäljempänä 23 kohdassa esitetyt tekijät, suurin annos on yleensä valittava siten, että se aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, mikä näkyy esimerkiksi painon nousun hidastumisena (noin 10 prosentilla). Tutkimuksen tavoitteiden mukaan (katso 6 kohta) suurimmaksi annokseksi voidaan valita myös pienempi annos kuin se, joka aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, jos jokin annos aiheuttaa esimerkiksi huolestuttavan haittavaikutuksen, joka vaikuttaa kuitenkin vain vähän elinaikaan tai ruumiinpainoon.

23. Annostasot ja niiden porrastus voidaan valita annosvasteen ja – testikemikaalin vaikutustavan mukaan – NOAEL-arvon määrittämisen tai tutkimuksen muun tavoitteen (esimerkiksi BMD-arvo (katso 25 kohta) pienimmän annoksen tasolla) saavuttamisen perusteella. Pienempien annosten määrittämisessä huomioon otettavia tekijöitä ovat annos-vastekäyrän odotuksenmukainen kulmakerroin, annokset, joiden yhteydessä saattaa ilmetä tärkeitä muutoksia metaboliassa tai myrkyllisen vaikutuksen tavassa, odotuksenmukainen raja-arvo tai arvo, jota pidetään lähtökohtana pienen annoksen ekstrapolaatiolle.

24. Valittu annostason porrastus määräytyy testikemikaalin ominaisuuksien perusteella, eikä sitä voida määrätä tässä testimenetelmässä. Kaksinkertaiset-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi 6–10-kertaisia annosvälejä). Yleisesti ottaen on pyrittävä välttämään käyttämästä kertoimia, jotka ovat suurempia kuin 10, ja niiden mahdollinen käyttö on perusteltava.

25. Kuten ohjeasiakirjassa GD 116 (7) on täsmennetty, annoksen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— Tunnetut tai oletetut epälineaarisuudet tai käännepisteet annosvasteessa

— Toksikokinetiikka ja pitoisuusalueet, joilla ilmenee tai ei ilmene metabolian induktiota, saturaatiota tai epälineaarisuutta ulkoisten ja sisäisten annosten välillä

— Leesioiden esiasteet, vaikutusten merkkiaineet tai keskeisten biologisten prosessien toimintaa osoittavat indikaattorit

— Vaikutustapaan liittyvät keskeiset (tai oletetut) näkökohdat, kuten annokset, joilla alkaa ilmetä sytotoksisuutta, hormonipitoisuuksien ja homeostaattisten mekanismien häiriintymistä jne.

▼M4

— Annos-vastekäyrän alueet, joilla tarvitaan erittäin yksityiskohtainen estimointi, esimerkiksi ennakoidun viitearvon tai oletetun raja-arvon kohdalla

— Ihmisten ennakoituja altistumistasoja koskeva pohdinta.

26. Verrokkiryhmän tulee olla joko ryhmä, joka ei saa käsittelyä, tai kantaja-ainetta saava ryhmä, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmien eläimiä. Jos käytetään kantaja-ainetta, verrokkiryhmälle tulee antaa tilavuudeltaan suurin annosryhmissä käytetty kantaja-aineannos. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna ja jos se vähentää ravinnonottoa sen vuoksi, ettei ravinto maita eläimelle entiseen tapaan, normaaliravintoa saava verrokkiryhmä voi olla sopivampi.

Annosten valmistelu ja testikemikaalin antaminen

27. Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta ruoan tai juomaveden seassa tai ruokintaletkulla. Lisätietoja antoreiteistä ja -tavoista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Antoreitti ja antotapa määräytyvät tutkimuksen tarkoituksen, testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien ja sen biologisen hyötyosuuden sekä ihmisten yleisimmän altistumisreitin ja -tavan perusteella. Valitulle antoreitille ja -tavalle on esitettävä perustelut. Eläinten hyvinvoinnin vuoksi suun kautta käytettävä ruokintaletku on valittava yleensä vain sellaisille aineille, joiden osalta tämä antoreitti ja -tapa ovat todennäköisesti mahdollisia ihmisten altistumisen yhteydessä (esimerkiksi lääkkeet). Torjunta-aineita sisältävät ravinto- tai ympäristökemikaalit annetaan yleensä ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna. Joidenkin skenaarioiden, kuten työperäisen altistuksen, yhteydessä kemikaalin antaminen muita antoreittejä pitkin voi kuitenkin olla tarkoituksenmukaisempaa.

28. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. Seuraavat mahdolliset kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, metaboliaan tai testikemikaalin pidättymiseen (retentioon) elimistössä; sellaiset vaikutukset testikemikaalin kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyllisiä ominaisuuksia; vaikutukset ravinnon ja veden kulutukseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muita kantaja-aineita. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen myrkylliset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiiliudesta ja annosteluliuosten homogeenisuudesta tai ruokavalioista (tarvittaessa) annosteluolosuhteissa (esimerkiksi ravinto) on oltava saatavilla tietoa.

29. Jos kemikaaleja annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalimäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Pitkäaikaisissa myrkyllisyystutkimuksissa, joissa testikemikaalia annetaan ravinnon seassa, testikemikaalin pitoisuus eläinten ruoassa saa yleensä olla enintään viisi prosenttia kokonaisruokavaliosta, jotta vältetään ravitsemuksellinen epätasapaino. Kun testikemikaali annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (mg/kg-ruokavalio tai ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa (mg painokiloa kohti). Molemmat lasketaan viikoittain. Valittu vaihtoehto on mainittava.

▼M4

30. Suun kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin (seitsemänä päivänä viikossa), jyrsijöillä yleensä 24 kuukauden ajan (katso myös 32 kohta). Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä (jos testikemikaalia annetaan esimerkiksi viitenä päivänä viikossa), se on perusteltava. Ihon kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia vähintään kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, kuten tämän liitteen B.9 luvussa (11) on täsmennetty, vähintään 24 kuukauden ajan. Hengitysteiden kautta altistuksessa testikemikaalia annetaan kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, mutta myös altistusta viitenä päivänä viikossa voidaan käyttää, jos se on perusteltua. Altistusjakso on yleensä 24 kuukautta. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä, se on perusteltava. Katso myös tämän liitteen luku B.8 (9).

31. Kun testikemikaali annetaan eläimille ruokintaletkulla, on käytettävä mahaletkua tai sopivaa intubaatiokanyylia, ja kemikaali on annettava joka päivä samoihin aikoihin. Yleensä kerta-annos annetaan kerran päivässä, mutta jos kemikaali on esimerkiksi paikallisesti ärsyttävä aine, päivittäinen annos voidaan antaa myös jaettuna (kaksi kertaa päivässä). Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Tilavuus tulee pitää mahdollisimman pienenä, ja jyrsijöillä se saa olla yleensä enintään 1 ml 100 g:n painoa kohti (31). Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta sen varmistamiseksi, että tilavuus on sama kaikilla annostasoilla. Poikkeuksena ovat mahdollisesti syövyttävät tai ärsyttävät kemikaalit, jotka on laimennettava vakavien paikallisten vaikutusten välttämiseksi. On vältettävä testausta sellaisilla pitoisuuksilla, jotka todennäköisesti syövyttävät tai ärsyttävät maha-suolikanavaa.

Tutkimuksen kesto

32. Jyrsijöiden osalta tutkimus kestää yleensä 24 kuukautta, mikä on valtaosa käytettävien eläinten normaalista elinajasta. Tutkimus voi olla tätä pidempi tai lyhyempi sen mukaan, mikä on tutkimuksessa käytettävän eläinlajin kannan elinaika, mutta tämä on kuitenkin perusteltava. Tietyille hiirikannoille, joita ovat esimerkiksi AKR/J, C3H/J tai C57BL/6J, 18 kuukauden mittainen tutkimus voi olla sopivampi. Ohjeita tutkimuksen kestosta, päättymisestä ja tutkimuksessa havaitun eloonjäämisen käsittelemisestä sekä lisäohjeita negatiivisen karsinogeenisuuden hyväksyttävyydestä suhteessa tutkimuksessa ilmenneeseen eloonjäämiseen on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelua ja toteuttamista (7).

— Tutkimuksen lopettamista on harkittava, kun eloonjääneiden eläinten määrä pienemmän annoksen ryhmissä tai verrokkiryhmässä on pienempi kuin 25 prosenttia.

— Jos vain suuren annoksen ryhmä kuolee ennenaikaisesti myrkyllisyyden vuoksi, tutkimusta ei tule lopettaa.

— Eloonjäämistä on käsiteltävä kummankin sukupuolen osalta erikseen.

— Tutkimusta ei tule jatkaa sen jälkeen, kun tutkimuksesta saatavat tiedot eivät enää riitä tilastollisesti validin arvioinnin tekemiseen.

▼**M4**

HAVAINNOT

33. Kaikki eläimet on tutkittava sairastuvuuden tai kuolleisuuden havaitsemiseksi yleensä jokaisen päivän aamulla ja illalla myös viikonloppuisin ja lomien aikana. Lisäksi eläimet on tutkittava kerran päivässä toksikologisesti merkityksellisten erityisten merkkien havaitsemiseksi. On otettava huomioon, että kun testikemikaalia annetaan ruokintaletkun kautta, odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen. Erityistä huomiota on kiinnitettävä kasvainten kehittymiseen. Jokaisen paljain silmin tai käsin tunnustelemalla havaittavissa olevan kasvaimen toteamisaika, paikka, koko, ulkonäkö ja kehitys on kirjattava.

Ruumiinpaino, ravinnon/veden kulutus ja ruumiinpainon lisäys

34. Kaikki eläimet on punnittava käsittelyn alussa, vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Ravinnon kulutus ja painon lisäys on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Veden kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuussa, kun testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna. Veden kulutuksen mittaamista on harkittava myös sellaisissa tutkimuksissa, joissa eläimen juomistottumukset muuttuvat.

Hematologia, kliininen biokemia ja muut mittaukset

35. Jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa erityisesti vaikutustapaa koskevia pohdintoja varten, eläimiltä voidaan ottaa tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella verinäytteet hematologisia ja kliinis-biokemiallisia määrityksiä varten. Myös virtsa-analyysi voi olla tarpeen. Lisätietoa tällaisten näytteiden ottamisen hyödyllisyydestä osana karsinogeenisuustutkimusta on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Tarvittaessa verinäytteet hematologisia ja kliinis-biokemiallisia määrityksiä ja virtsa-analyysia varten voidaan ottaa kesken tutkimuksen tapahtuvien lopetusten yhteydessä (20 kohta) ja tutkimuksen päättyessä vähintään 10 eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti. Verinäytteet on otettava nimetystä paikasta esimerkiksi sydänpunktiolla tai silmäntakaisesta laskimopunoksesta anestesiassa, ja niitä on tarvittaessa säilytettävä asianmukaisissa olosuhteissa. Verinäytteet voidaan valmistella myös tutkimusta varten etenkin, jos kohde-elin vaikuttaa olevan luuydin, joskin tällaisen tutkimuksen arvoa mahdollisen karsinogeenisuuden/onkogeenisuuden arvioinnissa on pidetty kyseenalaisena (32).

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

36. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille paitsi erityisvalvonnassa oleville eläimille (katso 20 kohta) on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Erityisvalvonnassa olevien eläinten ruumiinavauksen tarve määräytyy tapauskohtaisesti tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella. Yleensä elinten painot eivät kuulu karsinogeenisuutta käsittelevään tutkimukseen, koska geriatriset muutokset ja myöhemmissä vaiheissa kasvainten kehittyminen mitätöivät elinten painoa koskevien tietojen käyttökelpoisuuden. Nämä tiedot voivat kuitenkin olla erittäin tärkeitä näyttöön perustuvan arvioinnin toteuttamisessa ja etenkin vaikutustapaa koskevissa pohdinnoissa. Jos ne ovat osa satelliittitutkimusta, ne on kerättävä viimeistään vuoden kuluttua tutkimuksen aloittamisesta.

▼M4

37. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (33) (hakasulkeissa olevat kudokset ovat valinnaisia):

Kaikki suuret leesiot	Sydän	Haima	Maha (etumaha, rauhasmaha)
Lisämunuainen	Sykkyräsuoli	Lisäkilpirauhanen	[Hampaat]
Aortta	Tyhjäsuoli	Ääreishermo	Kivekset
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Munuaiset	Aivolisäke	Kateenkorva
Umpisuoli	Kyynelrauhanen (silmän ulkopuolelta)	Eturauhanen	Kilpirauhanen
Kohdunkaula	Maksa	Peräsuoli	[Kieli]
Eturauhasen etuosa	Keuhkot	Sylkirauhanen	Henkitorvi
Paksusuoli	Imusolmukkeet (pinnalliset ja syvät)	Rakkularauhanen	Virtsarakko
Pohjukaissuoli	Rintarauhanen (pakollinen naarailla; mikäli selvästi dissekoitavissa, myös uroksilla)	Luurankolihas	Kohtu (mukaan luettuna kohdunkaula)
Lisäkivekset	[Ylähengitystiet, mukaan luettuina nenä, kuorikot ja sivuontelot]	Iho	[Virtsanjohdin]
Silmä (mukaan luettuna verkkokalvo)	Ruokatorvi	Selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)	[Virtsaputki]
[Reisiluu ja nivel]	[Hajurauhanen]	Perna	Vagina
Sappirakko (muut lajit kuin rotta)	Munasarjat	[Rintalasta]	Osa luuydintä ja/tai tuore luuydinaspiraatti
Harderin rauhaset			

Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on säilytettävä. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös elimet, joita pidetään testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköisinä kohde-eliminä, on säilytettävä. Tutkimuksissa, joissa altistus tapahtuu ihon kautta, on säilytettävä ne elimet, jotka on lueteltu suun kautta altistuksen yhteydessä. On oleellista, että näyte otetaan nimenomaan siitä kohdasta ihoa, johon testikemikaalia on annosteltu, ja että kyseinen ihokohta säilytetään. Hengitysteiden kautta altistumista koskevien tutkimusten yhteydessä hengityselimistön säilytettävien ja tutkittavien kudosten luettelon osalta on noudatettava tämän liitteen luvussa B.8 (8) ja luvussa B.29 (9) annettuja suosituksia. Muiden elinten/kudosten osalta (ja hengityselimistöstä otettujen kudosten lisäksi) on tutkittava ne elimet, jotka on mainittu suun kautta altistuksen yhteydessä esitetyssä luettelossa.

▼M4

Histopatologia

38. Toksikologis-patologisten tutkimusten toteuttamisen parhaista käytännöistä on saatavana ohjeistusta (33). Vähintään seuraavat kudokset on tutkittava:

— kaikki kudokset suuren annoksen ryhmästä ja verrokkiryhmästä

— kaikki kudokset tutkimuksen aikana kuolleilta tai lopetetuilta eläimiltä

— kaikki kudokset, joissa on makroskooppisia poikkeavuuksia

— Jos suuren annoksen ryhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä histopatologisia muutoksia, samat kudokset on tutkittava kaikilta eläimiltä kaikissa muissa annosryhmissä.

— Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on tutkittava.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

39. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava tiedot kaikista arvioiduista parametreista. Yhteenveto tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin testiryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, testin aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, merkkejä myrkyllisyydestä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen myrkyllisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin. Yhteenvetotaulukoissa on ilmoitettava keskiarvot ja keskihajonnat (jatkuvan testin tietojen osalta) niistä eläimistä, joilla ilmeni toksisia vaikutuksia tai vaurioita. Myös vaurioiden vaikeusaste on ilmoitettava.

40. Aiemmista vertailutiedoista voi olla apua tutkimuksen tulosten tulkinnassa esimerkiksi silloin, kun näyttää siltä, että samanaikaisista verrokeista saadut tiedot ovat merkittävästi erilaisia verrattuna saman testilaitoksen/kolonian verrokkieläimiltä saatuihin uudempiin tietoihin. Jos aiempia tietoja arvioidaan, niiden on oltava peräisin samasta laboratoriosta ja liityttävä eläimiin, jotka ovat samanikäisiä ja sellaisesta kannasta, joka on tuotettu kyseistä tutkimusta edeltäneen viiden vuoden aikana.

41. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Tilastolliset menetelmät ja analysoitavat tiedot on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa (9 kohta). Valinnassa on otettava huomioon myös eloonjäämistä koskevat korjaukset, mikäli tarpeen.

Testiraportti

42. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot

▼**M4**

— kemikaalin lähde

— eränumero

— todistus kemiallisesta analyysista.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty laji/kanta ja perustelut niiden valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli testin alussa

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

Testiolosuhteet:

— antoreitin ja annoksen valinnan perustelut

— tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset menetelmät tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta / ravintovalmisteesta

— analyysitiedot valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta sekä sen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

— antoreitti ja yksityiskohdat testikemikaalin annostelusta

— inhalaatiotutkimuksissa tieto siitä, käytettiinkö vain nasaalista altistusta vai koko kehoon kohdistuvaa altistusta

— todelliset annokset (mg painokiloa kohti päivässä) ja muuntokerroin, jolla ravintovalmisteen/juomaveden testikemikaalipitoisuus (mg/kg tai ppm) muunnetaan todelliseksi annokseksi, mikäli tarpeen

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Tulokset (tiedot on esitettävä yhteenvetotaulukossa ja jokaisesta eläimestä erikseen)

Yleiset tiedot

— eloonjäämistä koskevat tiedot

— ruumiinpaino / ruumiinpainon muutokset

— ravinnon kulutus, ruumiinpainon lisäystä koskeva laskelmat, jos ne on tehty, sekä veden kulutus tarvittaessa

— toksikokineettiset tiedot (jos saatavilla)

— silmätutkimuksen tiedot (jos saatavilla)

— hematologiset tiedot (jos saatavilla)

— kliinis-biokemialliset tiedot (jos saatavilla).

▼M4

Kliiniset löydökset

— myrkyllisyyden merkit

— kaikkien poikkeavuuksien ilmaantuvuus (ja vaikeusaste, jos pisteytetty)

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta).

Ruumiinavaustiedot

— eläimen paino testin lopussa

— elinten painot (ja niiden suhteet tarvittaessa)

— ruumiinavauslöydökset, poikkeavuuksien ilmaantuvuus ja vaikeusaste.

Histopatologia

— muut kuin neoplastiset histopatologiset löydökset

— neoplastiset histopatologiset löydökset

— makroskooppisten ja mikroskooppisten löydösten välinen korrelaatio

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista käsittelyyn liittyvistä histopatologisista löydöksistä sekä niiden vaikeusaste

— raportti objektilasien vertaisarvioinnista.

Tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa

Tulosten pohdinta, mukaan luettuina seuraavat seikat:

— mallintamistapoja koskeva pohdinta

— annos-vastesuhteet

— aiemmat vertailutiedot

— vaikutustapaa koskeviin tietoihin liittyvä pohdinta

— BMD-, NOAEL- tai LOAEL-arvojen määritykset

— merkitys ihmisten kannalta.

Päätelmät

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.

5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

▼M4

6) Tämän liitteen luku B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä)

7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Tämän liitteen luku B.8 (Subkrooninen myrkyllisyys hengitettynä: 28 päivän tutkimus).

10) Tämän liitteen luku B.29 Subkrooninen myrkyllisyys hengitettynä: 90 päivän tutkimus.

11) Tämän liitteen luku B.9 (Toistetun annoksen (28 päivää) myrkyllisyys (ihon kautta nautittavat aineet)).

12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.

13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.

14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51–56.

15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591–653.

16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼M4

22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF&Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. S. 279–284.

26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196–1203.

27) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta, EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33.

28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15–23.

32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198–201.

33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

B. 33 **YHDISTETTY KROONINEN MYRKYLLISYYS-/KARSINOGEENISUUSTUTKIMUS**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 453 (2009). Alkuperäinen testiohje nro 453 hyväksyttiin vuonna 1981. Tämän tarkistetun testimenetelmän B.33 kehittäminen katsottiin tarpeelliseksi, jotta siinä voidaan ottaa huomioon eläinten hyvinvointiin ja sääntelyvaatimuksiin liittyvä viimeaikainen kehitys (1) (2) (3) (4) (5). Tämän testimenetelmän B.33 ajantasaistus on toteutettu yhdessä tässä liitteessä olevan luvun B.32 (Karsinogeenisuustesti) ja luvun B.30 (Krooninen myrkyllisyystesti) tarkistusten kanssa. Tavoitteena on saada lisää tietoa tutkimuksessa käytetyistä eläimistä ja yksityiskohtaisempaa tietoa annoksen valinnasta. Tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi monien erilaisten kemikaalien, torjunta-aineiden ja teollisuuskemikaalien testauksessa. Todettakoon kuitenkin, että jotkin yksityiskohdat ja vaatimukset saattavat erota lääkkeitä koskevista vaatimuksista [katso kansainvälisen harmonisointikonferenssin (ICH:n) ohje S1B lääkkeiden karsinogeenisuuden testauksesta].

2. Koska valtaosa kroonisista myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksista tehdään jyrsijälajeilla, tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi ensisijaisesti tutkimuksissa, jotka tehdään näillä lajeilla. Jos näitä tutkimuksia on tehtävä muilla lajeilla kuin jyrsijöillä, tässä testimenetelmässä kuvattujen periaatteiden ja menetelmien lisäksi voidaan soveltaa myös tässä liitteessä olevassa luvussa B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) (6) kuvattuja periaatteita ja menetelmiä asianmukaisin muutoksin, kuten OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (Kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelu ja toteutus) (7) on määritelty.

3. Kroonisissa myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimuksissa käytettävät kolme pääasiallista antoreittiä ovat suun kautta, ihon kautta ja hengitysteiden kautta. Antoreitti valitaan testattavan kemikaalin fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä ihmisten todennäköisen altistumisreitin mukaan. Lisätietoja altistusreitin valinnasta on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

4. Tässä testimenetelmässä keskitytään suun kautta altistukseen, koska se on yleisimmin käytetty altistusreitti kroonisissa myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksissa. Vaikka pitkäaikaiset tutkimukset, joihin sisältyy ihon tai hengitysteiden kautta altistus, voivat olla tarpeen ihmisten terveysriskien arvioinnissa ja/tai vaikka niitä voidaan tarvita tiettyjen sääntelyohjelmien nojalla, molemmat altistusreitit ovat teknisesti erittäin monimutkaisia. Tällaiset tutkimukset on suunniteltava tapauskohtaisesti, joskin tässä kuvattu testimenetelmä, joka on tarkoitettu suun kautta altistuksesta aiheutuvan kroonisen myrkyllisyyden tai karsinogeenisuuden määrittämiseen ja arviointiin, voi olla pohjana hengitysteiden ja/tai ihon kautta tapahtuvaa altistusta koskeville tutkimuksille käsittelyaikoja sekä kliinisiä ja patologisia parametreja jne. koskevien suositusten osalta. Saatavilla on OECD:n ohje testikemikaalien annostelusta hengitysteiden (7) (8) ja ihon (7) kautta. Kun suunnitellaan pitempiaikaisia tutkimuksia, joihin liittyy altistus hengitysteiden kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9) sekä OECD:n ohjeasiakirjaa, joka koskee akuuttia testausta hengitysteiden kautta (7). Kun altistustestaus toteutetaan ihon kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.9 (11).

▼M4

5. Yhdistetystä myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimuksesta saadaan tietoja mahdollisista terveyshaitoista, joita toistuvasta altistuksesta todennäköisesti seuraa ja jotka kestävät jopa käytettyjen lajien koko eliniän ajan. Tutkimuksesta saadaan tietoa testikemikaalin myrkyllisistä vaikutuksista ja mahdollisesta karsinogeenisuudesta, ja sen avulla voidaan tunnistaa kohde-elimet ja kemikaalin mahdollinen kertyminen. Lisäksi tutkimuksesta voidaan saada arvio tasosta, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL). Ei-genotoksisten karsinogeenien osalta voidaan määrittää kasvainvasteet, joita voidaan käyttää laadittaessa turvallisuuskriteereitä ihmisten altistumiselle. Korostettakoon, että eläinten huolellinen kliininen tarkkailu on hyvin tärkeää, jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa.

6. Tämän testimenetelmän kattamien kroonisten myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimusten tavoitteet ovat seuraavat:

— Testikemikaalin sellaisten karsinogeenisten ominaisuuksien tunnistaminen, jotka lisäävät kasvainten ilmaantuvuutta tai pahanlaatuisten kasvainten määrää tai vähentävät kasvainten syntymiseen kuluvaa aikaa verrattuna samanaikaisiin verrokkiryhmiin.

— Kasvainten ilmaantumiseen kuluvan ajan määrittäminen

— Testikemikaalin kroonisen myrkyllisyyden määrittäminen

— Kroonisen myrkyllisyyden ja karsinogeenisuuden kohde-elimen (-elinten) tunnistaminen

— Annos-vastesuhteen luonnehdinta

— NOAEL-arvon (tason, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta) määrittäminen tai viiteannoksen (BMD:n) määrittämisen lähtökohta

— Karsinogeenisten vaikutusten ekstrapolointi ihmisten altistumistasoihin pienillä annoksilla

— Kroonisten myrkyllisyysvaikutusten ennustaminen ihmisten altistumistasoilla

— Tiedon tuottaminen vaikutustapaa koskevia testihypoteeseja varten (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Kun määritetään ja arvioidaan testikemikaalin mahdollista karsinogeenisuutta ja kroonista myrkyllisyyttä, testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista, jotta tutkimus voidaan suunnitella siten, että kemikaalin toksikologisia ominaisuuksia voidaan testata tehokkaasti ja jotta eläinten käyttö voidaan pitää mahdollisimman vähäisenä. Epäillyn karsinogeenin vaikutustapaa koskevat tiedot ja niiden ottaminen huomioon (2) (7) (12) (13) (14) (15) on erittäin tärkeää, koska paras tutkimusmenetelmä voi vaihdella sen mukaan, tiedetäänkö vai epäillääänkö testikemikaalin olevan genotoksinen karsinogeeni. Lisätietoa vaikutustapaa koskevista huomioista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

8. Tietoihin, joista on apua tutkimuksen suunnittelussa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tiedot vaikutustavasta, *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien ja genotoksisuustestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (odotettavissa olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot, mutageenisuus/genotoksisuustiedot, karsinogeenisuustiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista, saatavilla olevat toksikokineettiset tiedot (kerta-annoksen ja myös toistuvan annoksen kinetiikka, jos saatavilla) sekä muista toistuvaa altistusta käsitelleistä tutkimuksista saadut tiedot. Krooninen myrkyllisyys/karsinogeenisuus on

▼M4

määritettävä vasta sitten, kun myrkyllisyydestä on saatu alustavia tietoja toistetuilla annoksilla suoritetuista 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystesteistä. Lyhytaikaiset testit, joissa tutkitaan syövän puhkeamista ja etenemistä, voivat antaa myös hyödyllistä tietoa. Karsinogeenisuustestauksen osalta on harkittava vaiheittaista testaustapaa osana tietyn testikemikaalin mahdollisten terveyteen kohdistuvien haitallisten vaikutusten kokonaisarviointia (16) (17) (18) (19).

9. Ennen tutkimuksen aloittamista on määritettävä tulosten analysointiin sopivimmat tilastomenetelmät koejärjestelyt ja tavoitteet huomioon ottaen. On pohdittava sitä, onko tilastoihin sisällytettävä eloonjäämistä koskeva korjaus, kumulatiivisten kasvainriskien analyysi suhteessa eloonjäämisen pituuteen, kasvaimen ilmaantumiseen kuluvaa aikaa koskeva analyysi sekä analyysi, joka on tehtävä, jos testi keskeytyy yhdessä tai useammassa ryhmässä ennenaikaisesti. Asianmukaisia tilastollisia analyyseja koskevia ohjeita sekä keskeiset viitetiedot kansainvälisesti hyväksytyistä tilastomenetelmistä on ohjeasiakirjassa GD 116 (7) sekä ohjeasiakirjassa GD 35, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten analyysia ja arviointia (20).

10. Karsinogeenisuustutkimuksia tehtäessä on noudatettava aina periaatteita ja näkökohtia, jotka on määritelty OECD:n ohjeasiakirjassa (Turvallisuuden arvioinneissa käytetyillä koe-eläimillä ilmenevien kliinisten merkkien tunnistaminen, arvioiminen ja käyttäminen humaaneina lopettamiskriteereinä) (21) ja eritoten sen 62 kohdassa. Kyseisessä kohdassa todetaan näin: ”Kun tutkimuksissa, joihin sisältyy toistuvaa annostelua, eläin osoittaa sellaisia kliinisiä merkkejä, jotka ovat progressiivisia ja jotka johtavat eläimen tilan huonontumiseen, on tehtävä tietoon perustuva päätös siitä, tuleeko eläin lopettaa humaaneista syistä. Päätöstä tehtäessä on otettava huomioon, mitä tutkimuksellista arvoa eläimen hengissä pitämisen jatkamisesta saatavalla tiedolla on suhteessa sen yleistilaan. Jos eläin päätetään pitää testissä edelleen, havaintoja on tehtävä tiheämmin, mikäli tarpeen. On myös mahdollista keskeyttää annostus tai pienentää testiannosta väliaikaisesti, mikäli se lievittää tuskia tai kärsimyksiä, ilman että se haittaa testin tarkoitusta.”

11. Tarkempia ohjeita ja kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten annoksen valintaa ohjaavia periaatteita on ohjeasiakirjassa GD 116 (7) sekä kahdessa International Life Sciences Instituten julkaisussa (22) (23). Keskeinen annoksen valintastrategia määräytyy tutkimuksen ensisijaisen tavoitteen tai ensisijaisten tavoitteiden mukaisesti (6 kohta). Asianmukaisia annostasoja valittaessa on pyrittävä saavuttamaan tasapaino yhtäältä vaarojen seulonnan ja toisaalta pieniin annoksiin liittyvien vasteiden ja niiden merkityksen välillä. Tämä on erityisen tärkeää yhdistetyssä kroonisessa myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksessa.

12. Tällaisen yhdistetyn kroonisen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksen toteuttamista on harkittava erillisen kroonisen myrkyllisyystutkimuksen (tämän liitteen luku B.30) ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.32) sijasta. Kahteen erilliseen tutkimukseen verrattuna yhdistetty tutkimus on ajan ja kustannusten kannalta tehokkaampi, mutta tietojen laatu ei vaarannu kroonisessa vaiheessa tai karsinogeenisuutta käsittelevässä vaiheessa. Kun tehdään yhdistetty krooninen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimus, on kiinnitettävä erityistä huomiota annoksen valinnan periaatteisiin (11 ja 22–26 kohta). Todettakoon, että tiettyjen sääntelypuitteiden nojalla voidaan edellyttää erillisiä tutkimuksia. Lisäohjeita yhdistetyn kroonisen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksen suunnittelusta tutkimuksen tehokkuuden maksimoimiseksi siltä kannalta, että eläinten määrää voidaan mahdollisesti vähentää ja että erilaisia koemenetelmiä voidaan yhtenäistää, on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

▼M4

13. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät on esitetty tämän kohdan lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

TESTIN PERIAATE

14. Tutkimusmenetelmä koostuu kahdesta rinnakkaisesta vaiheesta, jotka ovat krooninen vaihe ja karsinogeenisuusvaihe (vaiheiden kesto: katso 34 ja 35 kohta). Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta, mutta myös hengitysteiden tai ihon kautta testaus voi olla asianmukaista. Kroonisessa vaiheessa testikemikaalia annetaan päivittäin erisuuruisina annoksina useille koe-eläinryhmille yleensä 12 kuukauden ajan, joskin on mahdollista valita tätä pidempi tai lyhyempi aika sääntelyvaatimusten mukaisesti (katso 34 kohta). Tämän pituisen ajan katsotaan olevan riittävän pitkä, jotta mahdolliset kumulatiivisen myrkyllisyyden vaikutukset tulevat esiin ilman geriatristen muutosten häiritseviä vaikutuksia. Tutkimussuunnitelmaan voi myös sisältyä yksi tai useampi eläinten lopettamiskerta kesken kokeen esimerkiksi kolmen ja kuuden kuukauden kohdalla, ja tutkimukseen voidaan ottaa lisää eläinryhmiä tämän kompensoimiseksi (katso 20 kohta). Karsinogeenisuusvaiheessa testikemikaalia annetaan päivittäin useille koe-eläinryhmille suurimman osan niiden elinajasta. Kummankin ryhmän eläimiä havainnoidaan tarkasti myrkyllisyyden merkkien ja neoplastisten leesioiden kehittymisen havaitsemiseksi. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

15. Tämä testimenetelmä koskee ensisijaisesti jyrsijöillä ilmenevän kroonisen myrkyllisyyden ja karsinogeenisuuden määrittämistä ja arviointia (2 kohta). Muiden lajien kuin jyrsijöiden käyttöä voidaan harkita, kun saatavilla olevat tiedot viittaavat siihen, että muut lajit ovat oleellisempia ihmisten terveyteen kohdistuvien vaikutusten ennustamisessa. Lajin valinta on perusteltava. Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, mutta muitakin jyrsijöitä, esimerkiksi hiiriä, voidaan käyttää. Vaikka hiiren käyttämisestä karsinogeenisuustestauksessa koituva hyöty voi olla rajallinen (24) (25) (26), jotkin sääntelyohjelmat edellyttävät karsinogeenisuustestien tekemistä hiirellä, ellei päätetä, että tällainen tutkimus on tieteellisesti tarpeeton. Rottia ja hiiriä on käytetty ensisijaisina koe-eläiminä seuraavista syistä: niiden elinaika on suhteellisen lyhyt, niitä käytetään laajalti farmakologisissa ja toksikologisissa tutkimuksissa, niille muodostuu herkästi kasvaimia, ja saatavilla on kantoja, joita on luonnehdittu riittävästi. Tämän vuoksi niiden fysiologiasta ja patologiasta on saatavana paljon tietoa. Tarvittaessa muilla lajeilla kuin jyrsijöillä tehtävät krooniset myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimukset on suunniteltava ja toteutettava tässä testimenetelmässä kuvattujen sekä tämän liitteen luvussa B.27 (Oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) (6) kuvattujen periaatteiden mukaisesti. Lisätietoja lajin ja kannan valinnasta on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

16. Testissä tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koe-eläinkantoja. Yhdistetty myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimus on tehtävä mieluiten eläimillä, jotka ovat samaa kantaa ja samasta lähteestä kuin eläimet, joita käytettiin lyhyemmissä alustavissa myrkyllisyystutkimuksissa. Jos kyseisestä kannasta ja lähteestä peräisin olevien eläinten kuitenkin tiedetään aiheuttavan ongelmia pitkäaikaisissa tutkimuksissa yleensä käytettävien hyväksyttyjen eloonjäämiskriteerien täyttämisessä [katso ohjeasiakirja GD 116 (7)], on harkittava sellaisen eläinkannan käyttämistä, jonka eloonjäämisaste pitkäaikaisessa tutkimuksessa on hyväksyttävä. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

▼M4

Koe-eläintilat ja ruokinta

17. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Yksittäin pitämistä on harkittava vain, jos se on tieteellisesti perusteltua (27) (28) (29). Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, tulee kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion on vastattava kaikkia testattujen lajien ravintovaatimuksia. Ruokavalion sisältämien kontaminanttien määrän on oltava mahdollisimman pieni. Kontaminantteja, jotka saattavat vaikuttaa testin tuloksiin, ovat esimerkiksi torjunta-ainejäämät, pysyvät orgaaniset yhdisteet, fytoestrogeenit, raskasmetallit ja mykotoksiinit. Ravintoaine- ja kontaminanttipitoisuudesta on tuotettava analyyttista tietoa säännöllisesti, vähintään tutkimuksen alussa ja silloin, kun käytettävä erä muuttuu, ja nämä tiedot on sisällytettävä loppuraporttiin. Yhtä lailla on annettava analyyttista tietoa tutkimuksessa käytetystä juomavedestä. Ruokavalion valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa testikemikaalin ja eläinten ravintovaatimusten välinen tasapaino silloin, kun testikemikaalia annetaan ravintoon sekoitettuna.

Eläinten valmistelu

18. Testissä on käytettävä terveitä eläimiä, joita on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään seitsemän vuorokauden ajan ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Jyrsijöiden osalta testikemikaalin antaminen eläimille tulee aloittaa mahdollisimman pian vieroituksen ja totutuksen jälkeen, mielellään ennen kuin eläimet ovat kahdeksanviikkoisia. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja ikä on tunnettava. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun tulee olla mahdollisimman vähäistä, ja se saa vaihdella kummankin käytetyn sukupuolen osalta korkeintaan ± 20 prosenttia kaikkien tutkimuksessa käytettyjen eläinten keskimääräisestä painosta, joka on määritettävä kummallekin sukupuolelle erikseen. Eläimet tulee jakaa verrokki- ja testiryhmään satunnaistetusti. Satunnaistamisen jälkeen kummankaan sukupuolen ryhmissä ei saa olla suuria eroja keskimääräisessä painossa. Jos tilastollisesti merkitseviä eroja on, satunnaistamisvaihe on toistettava, mikäli mahdollista. Kullekin eläimelle tulee antaa oma tunnistenumero, joka on merkittävä eläimeen pysyvästi tatuoimalla, mikrosiruimplantilla tai muulla sopivalla tavalla.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

19. Testissä on käytettävä molempia sukupuolia. Testissä on käytettävä riittävää määrää eläimiä, jotta jokaisessa ryhmässä on tarpeeksi eläimiä tutkimuksen lopussa perusteellista biologista ja tilastollista arviointia varten. Jyrsijöiden osalta jokaisessa annosryhmässä (22 kohdassa määritetyn mukaisesti) ja samanaikaisessa verrokkiryhmässä, jotka on tarkoitettu tutkimuksen karsinogeenisuusvaiheeseen, on oltava vähintään 50 eläintä kumpaakin sukupuolta. Sen mukaan, mikä on tutkimuksen tavoite, keskeisten estimaattien tilastollista voimaa on mahdollista lisätä jakamalla eläimet eri annosryhmiin eri tavoin epätasaisesti siten, että pienen annoksen ryhmissä on yli 50 eläintä, jolloin voidaan esimerkiksi arvioida kemikaalin mahdollista karsinogeenisuutta pienillä annoksilla. On kuitenkin muistettava, että jos ryhmäkokoa kasvatetaan vain jonkin verran, tutkimuksen tilastollinen voima lisääntyy suhteellisen vähän. Jyrsijöiden osalta jokaisessa annosryhmässä (22 kohdassa määritetyn mukaisesti) ja samanaikaisessa verrokkiryhmässä, jotka

▼M4

on tarkoitettu tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheeseen, on oltava vähintään 10 eläintä kumpaakin sukupuolta. On huomattava, että tämä määrä on pienempi kuin kroonisessa myrkyllisyystutkimuksessa (tämän liitteen luku B.30). Vaikka tämän yhdistetyn tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa on vähemmän eläimiä jokaisessa ryhmässä, niistä saatujen tietojen tulkintaa tukevat kuitenkin tutkimuksen karsinogeenisuusvaiheesta saadut tiedot, jotka on saatu käyttämällä enemmän eläimiä. Tutkimuksissa, joissa käytetään hiiriä, saatetaan tarvita lisää eläimiä kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa kussakin annosryhmässä, jotta kaikki vaadittavat hematologiset määritykset saadaan tehtyä. Lisätietoa tutkimuksen tilastollisesta suunnittelusta ja annostasojen valinnasta tilastollisen voiman maksimoimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

Eläinten lopettamista kesken tutkimuksen, satelliittiryhmiä ja erityisvalvonnassa olevia eläimiä koskeva säännös

20. Tutkimuksessa voidaan hyödyntää mahdollisuutta lopettaa eläimiä kesken tutkimuksen esimerkiksi kuuden kuukauden kohdalla, jotta saadaan tietoa neoplastisten muutosten etenemisestä ja mekanistista tietoa, mikäli se on tieteellisesti perusteltua. Jos tällaisia tietoja on jo saatavana aiemmista samaa testikemikaalia koskevista toistetun annoksen myrkyllisyystutkimuksista, eläinten lopettaminen kesken tutkimuksen ei ole välttämättä tieteellisesti perusteltua. Tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa, joka kestää yleensä 12 kuukautta, käytetyistä eläimistä saadaan tutkimuksen karsinogeenisuusvaiheeseen tietoa kesken tutkimuksen lopetetuista eläimistä, jolloin käytettyjen eläinten kokonaismäärä siis pienenee. Tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheeseen voidaan sisällyttää myös satelliittiryhmiä, jotta tutkittavana olevan testikemikaalin aiheuttamien toksikologisten muutosten korjaantuvuutta voidaan seurata. Nämä ryhmät voidaan rajata tutkimuksen suurimpaan annoksen ryhmään ja verrokkiryhmään. Lisäksi tutkimukseen voidaan sisällyttää ryhmä erityisvalvonnassa olevia eläimiä (yleensä viisi eläintä kumpaakin sukupuolta) sairauden tilan seuraamiseksi tutkimuksen aikana, mikäli tarpeen (30). Lisätietoja siitä, miten tutkimussuunnitelmaan sisällytetään tutkimuksen aikana tapahtuvia lopettamisia, satelliittiryhmiä ja erityisvalvonnassa olevia eläimiä samalla, kun käytettävien eläinten kokonaismäärää pienennetään, on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

21. Jos tutkimussuunnitelmaan sisältyy kesken tutkimuksen tapahtuvia lopettamisia, kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten määrä jokaisessa annosryhmässä on yleensä 10 eläintä kumpaakin sukupuolta. Tutkimussuunnitelman mukaista eläinten kokonaismäärää on lisättävä ennen tutkimuksen päättymistä lopetettavaksi aiottujen eläinten määrällä. Näitä eläimiä on yleensä tarkkailtava samalla tavalla kuin päätutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa käytettäviä eläimiä: niiden ruumiinpainoa ja ravinnon-/vedenkulutusta on seurattava, ja hematologiset ja kliinisen biokemian mittaukset sekä patologiset tutkimukset on tehtävä, joskin mittaukset voidaan rajata (kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten ryhmissä) tiettyihin keskeisiin seikkoihin, kuten neurotoksisuuteen tai immunotoksisuuteen.

Annosryhmät ja annostus

22. Ohjeita kaikista annoksen valintaan ja annosten porrastamiseen liittyvistä näkökohdista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Vähintään kolmea annostasoa ja samanaikaista verrokkiryhmää on käytettävä sekä kroonista myrkyllisyyttä että karsinogeenisuutta tarkastelevissa vaiheissa. Annostasot perustuvat yleensä lyhyempien, toistetuilla annoksilla tehdyn testien tai annosalueen määritystestien tuloksiin, ja kaikki mahdolliset testikemikaalista tai samanlaisista kemikaaleista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon.

▼M4

23. Tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa täydellinen kolmea annostasoa soveltava tutkimus ei välttämättä ole tarpeen, jos voidaan ennustaa, että yksi annostaso, joka vastaa vähintään 1 000 mg:n annosta painokiloa kohti päivässä, ei todennäköisesti aiheuta haitallisia vaikutuksia. Tämän tulee perustua alustavista tutkimuksista saatuihin tietoihin ja siihen huomioon, ettei myrkyllisyyttä ole odotettavissa rakenteellisesti samanlaisia kemikaaleja koskevien tietojen perusteella. Tätä rajaa (1 000 mg painokiloa kohti päivässä) sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

24. Mikäli testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso on yleensä valittava siten, että sen avulla voidaan tunnistaa ensisijaiset kohde-elimet ja myrkylliset vaikutukset ilman, että annos aiheuttaa kärsimystä, vakavaa myrkyllisyyttä, sairastuvuutta tai kuolemaa. Suurin annos on valittava yleensä siten, että se aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, mikä näkyy esimerkiksi painon nousun hidastumisena (noin 10 prosentilla). Tutkimuksen tavoitteiden mukaan (katso 6 kohta) suurimmaksi annokseksi voidaan valita myös pienempi annos kuin se, joka aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, jos jokin annos aiheuttaa esimerkiksi huolestuttavan haittavaikutuksen, joka vaikuttaa kuitenkin vain vähän elinaikaan tai ruumiinpainoon.

25. Annostasot ja niiden porrastus voidaan valita annosvasteen ja – testikemikaalin vaikutustavan mukaan – NOAEL-arvon määrittämisen tai tutkimuksen muun tavoitteen (esimerkiksi BMD-arvo (katso 25 kohta) pienimmän annoksen tasolla) saavuttamisen perusteella. Pienempien annosten määrittämisessä huomioon otettavia tekijöitä ovat annos-vastekäyrän odotuksenmukainen kulmakerroin, annokset, joiden yhteydessä saattaa ilmetä tärkeitä muutoksia metaboliassa tai myrkyllisen vaikutuksen tavassa, odotuksenmukainen raja-arvo tai arvo, jota pidetään lähtökohtana pienen annoksen ekstrapolaatiolle. Kun toteutetaan yhdistetty karsinogeenisuutta / kroonista myrkyllisyyttä käsittelevä tutkimus, ensisijainen tavoite on hankkia tietoa karsinogeenisuudesta riskinarviointitarkoituksiin. Kroonista myrkyllisyyttä koskevien tietojen hankinta on useimmiten toissijainen tavoite. Tämä on syytä muistaa, kun valitaan tutkimuksen annostasoja ja niiden porrastusta.

26. Valittu annostason porrastus määräytyy tutkimuksen tavoitteiden ja testikemikaalin ominaisuuksien perusteella, eikä sitä voida määrätä tässä testimenetelmässä. Kaksinkertaiset-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi 6–10-kertaisia annosvälejä). Yleisesti ottaen on pyrittävä välttämään käyttämästä kertoimia, jotka ovat suurempia kuin 10, ja niiden mahdollinen käyttö on perusteltava.

27. Kuten ohjeasiakirjassa GD 116 (7) on täsmennetty, annoksen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— Tunnetut tai oletetut epälineaarisuudet tai käännepisteet annosvasteessa

— Toksikokinetiikka ja pitoisuusalueet, joilla ilmenee tai ei ilmene metabolian induktiota, saturaatiota tai epälineaarisuutta ulkoisten ja sisäisten annosten välillä

— Leesioiden esiasteet, vaikutusten merkkiaineet tai keskeisten biologisten prosessien toimintaa osoittavat indikaattorit

▼M4

— Vaikutustapaan liittyvät keskeiset (tai oletetut) näkökohdat, kuten annokset, joilla alkaa ilmetä sytotoksisuutta, hormonipitoisuuksien ja homeostaattisten mekanismien häiriintymistä jne.

— Annos-vastekäyrän alueet, joilla tarvitaan erittäin yksityiskohtainen estimointi, esimerkiksi ennakoidun viitearvon tai oletetun raja-arvon kohdalla

— Ennakoidut ihmisten altistumistasot etenkin keskisuuria ja pieniä annoksia valittaessa

28. Verrokkiryhmän tulee olla joko ryhmä, joka ei saa käsittelyä, tai kantaja-ainetta saava ryhmä, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmien eläimiä. Jos käytetään kantaja-ainetta, verrokkiryhmälle tulee antaa tilavuudeltaan suurin annosryhmissä käytetty kantaja-aineannos. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna ja jos se vähentää ravinnonottoa sen vuoksi, ettei ravinto maita eläimelle entiseen tapaan, normaaliravintoa saava verrokkiryhmä voi olla sopivampi.

Annosten valmistelu ja testikemikaalin antaminen

29. Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta ruoan tai juomaveden seassa tai ruokintaletkulla. Lisätietoja antoreiteistä ja -tavoista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Antoreitti ja antotapa määräytyvät tutkimuksen tarkoituksen, testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien ja sen biologisen hyötyosuuden sekä ihmisten yleisimmän altistumisreitin ja -tavan perusteella. Valitulle antoreitille ja -tavalle on esitettävä perustelut. Eläinten hyvinvoinnin vuoksi suun kautta käytettävä ruokintaletku on valittava yleensä vain sellaisille aineille, joiden osalta tämä antoreitti ja -tapa ovat todennäköisesti mahdollisia ihmisten altistumisen yhteydessä (esimerkiksi lääkkeet). Torjunta-aineita sisältävät ravinto- tai ympäristökemikaalit annetaan yleensä ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna. Joidenkin skenaarioiden, kuten työperäisen altistuksen, yhteydessä kemikaalin antaminen muita antoreittejä pitkin voi kuitenkin olla tarkoituksenmukaisempaa.

30. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. Seuraavat mahdolliset kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, metaboliaan tai testikemikaalin pidättymiseen (retentioon) elimistössä; sellaiset vaikutukset testikemikaalin kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyllisiä ominaisuuksia; vaikutukset ravinnon ja veden kulutukseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muita kantaja-aineita. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen myrkylliset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiiliudesta ja annosteluliuosten homogeenisuudesta tai ruokavalioista (tarvittaessa) annosteluolosuhteissa (esimerkiksi ravinto) on oltava saatavilla tietoa.

31. Jos kemikaaleja annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalimäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Pitkäaikaisissa myrkyllisyystutkimuksissa, joissa testikemikaalia annetaan ravinnon seassa, testikemikaalin pitoisuus eläinten ruoassa saa yleensä olla enintään viisi prosenttia kokonaisruokavaliosta, jotta vältetään ravitsemuksellinen epätasapaino. Kun testikemikaali annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (mg/kg-ruokavalio tai ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa (mg painokiloa kohti). Molemmat lasketaan viikoittain. Valittu vaihtoehto on mainittava.

▼M4

32. Suun kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin (seitsemänä päivänä joka viikko) 12 kuukauden ajan (krooninen vaihe) tai 24 kuukauden ajan (karsinogeenisuusvaihe), katso myös 33 ja 34 kohta. Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä (jos testikemikaalia annetaan esimerkiksi viitenä päivänä viikossa), se on perusteltava. Ihon kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia vähintään kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, kuten tämän liitteen luvussa B.9 (11) on täsmennetty, 12 kuukauden ajan (krooninen vaihe) tai 24 kuukauden ajan (karsinogeenisuusvaihe). Hengitysteiden kautta altistuksessa testikemikaalia annetaan kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, mutta myös altistusta viitenä päivänä viikossa voidaan käyttää, jos se on perusteltua. Altistusjakson pituus on yleensä 12 kuukautta (krooninen vaihe) tai 24 kuukautta (karsinogeenisuusvaihe). Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä, se on perusteltava. Katso myös tämän liitteen luku B.8 (9).

33. Kun testikemikaali annetaan eläimille ruokintaletkulla, on käytettävä mahaletkua tai sopivaa intubaatiokanyylia, ja kemikaali on annettava joka päivä samoihin aikoihin. Yleensä kerta-annos annetaan kerran päivässä, mutta jos kemikaali on esimerkiksi paikallisesti ärsyttävä aine, päivittäinen annos voidaan antaa myös jaettuna (kaksi kertaa päivässä). Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Tilavuus tulee pitää mahdollisimman pienenä, ja jyrsijöillä se saa olla yleensä enintään 1 ml 100 g:n painoa kohti (31). Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta sen varmistamiseksi, että tilavuus on sama kaikilla annostasoilla. Poikkeuksena ovat mahdollisesti syövyttävät tai ärsyttävät kemikaalit, jotka on laimennettava vakavien paikallisten vaikutusten välttämiseksi. On vältettävä testausta sellaisilla pitoisuuksilla, jotka todennäköisesti syövyttävät tai ärsyttävät maha-suolikanavaa.

Tutkimuksen kesto

34. Tämän tutkimuksen annostelujakso ja krooninen vaihe kestävät yleensä 12 kuukautta, mutta tutkimussuunnitelman mukaan testimenetelmää on mahdollista soveltaa joko lyhyempiin (esimerkiksi kuusi tai yhdeksän kuukautta) tai pitempiin (esimerkiksi 18 tai 24 kuukautta) tutkimuksiin tietyn lainsäädännön nojalla tai tiettyjen mekanististen tarkoitusten perusteella. Poikkeukset 12 kuukauden mittaisesta altistuksesta on perusteltava varsinkin, jos altistus on tätä lyhyempi. Kaikki tähän vaiheeseen kohdennetut annosryhmät lopetetaan määrättynä ajankohtana kroonisen myrkyllisyyden ja ei-neoplastisten muutosten arvioimiseksi. Tutkimukseen sisältyville satelliittiryhmille, joiden avulla seurataan tutkittavan testikemikaalin aiheuttamien toksikologisten muutosten korjaantuvuutta, ei saa antaa testikemikaalia vähintään neljään viikkoon eikä pidempään kuin kolmanneksen tutkimuksen kokonaiskestosta altistuksen päätyttyä.

35. Jyrsijöiden osalta tämän tutkimuksen karsinogeenisuusvaihe kestää yleensä 24 kuukautta, mikä on valtaosa käytettävien eläinten normaalista elinajasta. Tutkimus voi olla tätä pidempi tai lyhyempi sen mukaan, mikä on tutkimuksessa käytettävän eläinlajin kannan elinaika, mutta tämä on kuitenkin perusteltava. Tietyille hiirikannoille, joita ovat esimerkiksi AKR/J, C3H/J tai C57BL/6J, 18 kuukauden mittainen tutkimus voi olla sopivampi. Ohjeita tutkimuksen kestosta, päättymisestä ja tutkimuksessa havaitun eloonjäämisen käsittelemisestä sekä lisäohjeita negatiivisen karsinogeenisuuden hyväksyttävyydestä suhteessa tutkimuksessa ilmenneeseen eloonjäämiseen on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelua ja toteuttamista (7).

▼M4

— Tutkimuksen lopettamista on harkittava, kun eloonjääneiden eläinten määrä pienemmän annoksen ryhmissä tai verrokkiryhmässä on pienempi kuin 25 prosenttia.

— Jos vain suuren annoksen ryhmä kuolee ennenaikaisesti myrkyllisyyden vuoksi, tutkimusta ei tule lopettaa.

— Eloonjäämistä on käsiteltävä kummankin sukupuolen osalta erikseen.

— Tutkimusta ei tule jatkaa sen jälkeen, kun tutkimuksesta saatavat tiedot eivät enää riitä tilastollisesti validin arvioinnin tekemiseen.

HAVAINNOT (KROONISEN MYRKYLLISYYDEN VAIHE)

36. Kaikki eläimet on tutkittava sairastuvuuden tai kuolleisuuden havaitsemiseksi yleensä aamuin illoin joka päivä myös viikonloppuisin ja lomien aikana. Kliinisiä yleishavaintoja on tehtävä vähintään kerran päivässä mieluiten suurin piirtein samaan aikaan / samoihin aikoihin joka päivä. On otettava huomioon, että kun testikemikaalia annetaan ruokintaletkun kautta, odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen.

37. Kaikista eläimistä on tehtävä yksityiskohtaisia kliinisiä havaintoja vähintään kerran ennen ensimmäistä altistusta (jotta eläimessä havaittavia muutoksia voidaan verrata alkutilanteeseen), tutkimuksen ensimmäisen viikon päätteeksi ja kerran kuukaudessa sen jälkeen. Havainnointi on toteutettava siten, että yksittäisten havainnoijien välinen vaihtelu on mahdollisimman pientä ja testiryhmästä riippumatonta. Havainnot tulee tehdä eläimen oman häkin ulkopuolella mieluiten vakioalueella samaan kellonaikaan joka kerta. Havainnot on kirjattava tarkoin muistiin, mieluiten koelaboratorion erikseen määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä käyttäen. On pyrittävä varmistamaan, että havainnointiolosuhteissa on mahdollisimman vähän vaihtelua. Kirjattavia havaintoja ovat mm. ihon, karvapeitteen, silmien ja limakalvojen muutokset sekä sisäeritteiden, kuonaeritteiden ja autonomisen toiminnan (esimerkiksi kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko ja epätavallinen hengitys) esiintyminen. Käynnin, asennon ja käsittelyvasteen muutokset, mahdolliset klooniset tai tooniset liikkeet, stereotypiat (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esimerkiksi itsensä silpominen, takaperin käveleminen) tulee myös kirjata muistiin (32).

38. Kaikille eläimille on tehtävä silmätutkimus oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testikemikaalin ensimmäistä antokertaa. Tutkimuksen päätteeksi tämä tutkimus on tehtävä mieluiten kaikille eläimille, mutta vähintään suuren annoksen ryhmässä ja verrokkiryhmässä. Jos silmissä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, kaikki eläimet on tutkittava. Jos rakenteellinen analyysi tai muut tiedot viittaavat silmiin kohdistuvaan myrkyllisyyteen, silmätutkimuksia on tehtävä useammin.

39. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joiden osalta aikaisemmat toistetulla annoksella tehdyt 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystestit osoittivat niiden mahdollisesti aiheuttavan neurotoksisia vaikutuksia, voidaan lisäksi arvioida aistien reaktiivisuus erityyppisille ärsykkeille (32) (esimerkiksi kuulon, näön tai asentotunnon kautta välittyville ärsykkeille) (33) (34) (35), tarttumaotteen voimakkuus (36) ja motorinen toiminta (37) ennen tutkimuksen aloittamista ja kolmen kuukauden välein sen jälkeen, kunnes tutkimus on kestänyt 12 kuukautta, sekä tutkimuksen päättyessä (jos se kestää yli 12 kuukautta). Mahdollisten toimenpiteiden tarkemmat yksityiskohdat löytyvät mainituista kirjallisuusviitteistä. Myös muita kuin viittauksissa mainittuja toimenpiteitä voidaan käyttää.

▼M4

40. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joiden osalta aikaisemmat toistetulla annoksella tehdyt 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystestit osoittivat niiden mahdollisesti aiheuttavan immunotoksisia vaikutuksia, tätä tutkittavaa ominaisuutta koskevat tarkemmat tutkimukset voidaan tehdä tutkimuksen päättyessä.

Ruumiinpaino, ravinnon/veden kulutus ja ruumiinpainon lisäys

41. Kaikki eläimet on punnittava käsittelyn alussa, vähintään kerran viikossa ensimmäisen 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Ravinnon kulutus ja painon lisäys on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Veden kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuussa, kun testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna. Veden kulutuksen mittaamista on harkittava myös sellaisissa tutkimuksissa, joissa eläimen juomistottumukset muuttuvat.

Hematologia ja kliininen biokemia

42. Tutkimuksissa, joissa käytetään jyrsijöitä, hematologiset tutkimukset on tehtävä kaikille tutkimuseläimille (10 urosta ja 10 naarasta ryhmää kohti) kolmen, kuuden ja kahdentoista kuukauden jälkeen sekä tutkimuksen päättyessä (jos se kestää yli 12 kuukautta). Hiirten osalta saatetaan tarvita satelliittiryhmän eläimiä, jotta kaikki vaaditut hematologiset määritykset saadaan tehtyä (katso 19 kohta). Tutkimuksissa, joissa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, näytteet otetaan pienemmästä määrästä eläimiä (esimerkiksi koiratutkimuksissa neljältä eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti) saman näytteenottoaikataulun mukaisesti kuin jyrsijöilläkin sekä tutkimuksen päättyessä. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä jyrsijöillä eikä muilla eläimillä, jos hematologisissa parametreissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Verinäytteet on otettava nimetystä paikasta, esimerkiksi sydänpunktiolla tai silmäntakaisesta laskimopunoksesta anestesiassa.

43. Seuraavassa on luettelo parametreista, jotka on tutkittava (38): valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erittelylaskenta, punasolujen määrä, verihiutaleiden määrä, hemoglobiinipitoisuus, hematokriitti (punasolujen tilavuusosuus), punasolujen keskimääräinen tilavuus (MCV), keskihemoglobiini (MCH), keskihemoglobiinikonsentraatio (MCHC), protrombiiniaika ja aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika. Muita hematologisia parametreja (kuten Heinzin kappaleet, epätyypillinen punasolujen morfologia tai methemoglobiini) voidaan tarvittaessa mitata testikemikaalin myrkyllisyyden mukaan. Kaiken kaikkiaan on toimittava joustavasti tietystä kemikaalista havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaisesti. Jos testikemikaali vaikuttaa verta muodostavaan järjestelmään, retikulosyyttien määrän ja luuytimen sytologinen tutkimus voi olla aiheenmukaista, joskaan sitä ei tarvitse tehdä rutiininomaisesti.

44. Kliinisen biokemian määritykset tärkeimpien myrkyllisten kudosvaikutusten ja erityisesti munuais- ja maksavaikutusten tutkimiseksi tulee tehdä verinäytteistä, jotka otetaan kaikilta tutkimuseläimiltä (kymmenen urosta ja kymmenen naarasta jokaisesta ryhmästä) hematologisia tutkimuksia varten määritetyin aikavälein. Hiirten osalta saatetaan tarvita satelliittiryhmän eläimiä, jotta kaikki vaaditut kliinis- biokemialliset määritykset saadaan tehtyä. Tutkimuksissa, joissa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, näytteet otetaan pienemmästä määrästä eläimiä (esimerkiksi koiratutkimuksissa neljältä eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti) saman näytteenottoaikataulun mukaisesti kuin jyrsijöilläkin sekä tutkimuksen päättyessä. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä jyrsijöillä eikä muilla eläimillä, jos kliinisen biokemian parametreissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Eläinten

▼M4

ruokinnan siirtämistä yön yli (hiiriä lukuun ottamatta) ennen verinäytteen ottoa suositellaan ([1]). Seuraavassa on luettelo parametreista, jotka on tutkittava (38): glukoosi, virtsa (virtsan typpi), kreatiniini, kokonaisproteiini, albumiini, kalsium, natrium, kalium, kokonaiskolesteroli, vähintään kaksi hepatosellulaariseen arviointiin sopivaa testiä (alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, glutamaattidehydrogenaasi, kokonaissappihapot) (39), ja vähintään kaksi hepatobiliaariseen arviointiin sopivaa testiä (alkalinen fosfataasi, gammaglutamyylitransferaasi, 5'-nukleotidaasi, kokonaisbilirubiini, kokonaissappihapot) (39). Muita kliinis-kemiallisia parametreja, kuten paastotriglyseridit, tietyt hormonit ja koliiniesteraasi, voidaan mitata tarvittaessa testikemikaalin myrkyllisyyden mukaan. Kaiken kaikkiaan on toimittava joustavasti tietystä kemikaalista havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaisesti.

45. Virtsa-analyysit on tehtävä kaikilta tutkimuseläimiltä (10 urosta ja 10 naarasta jokaisesta ryhmästä) näytteistä, jotka otetaan samoina aikoina kuin hematologiset ja kliinis-kemialliset näytteet. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä, jos virtsa-analyysissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Seuraava parametriluettelo on kliinis-kemiallisia tutkimuksia koskevan asiantuntijasuosituksen mukainen (38): ulkonäkö, tilavuus, osmolaliteetti tai ominaistiheys, pH, kokonaisproteiini ja glukoosi. Muita määrityksiä ovat ketoaineet, urobilinogeeni, bilirubiini ja piilevä veri. Myös muita parametreja voidaan tarvittaessa käyttää, jos havaitun vaikutuksen (havaittujen vaikutusten) tutkimusta on laajennettava.

46. Koiratutkimuksissa lähtötilanteen hematologiset ja kliinis-biokemialliset muuttujat on yleensä määritettävä ennen käsittelyn aloittamista, mutta jyrsijätutkimuksissa niitä ei tarvitse määrittää (38). Jos aiemmat lähtötason tiedot ovat riittämättömät (katso 58 kohta), näiden tietojen hankkimista on harkittava.

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

47. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Mittaukset voidaan kuitenkin määrätä rajattavaksi (kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten ryhmässä tai satelliittiryhmässä) tiettyihin keskeisiin seikkoihin, kuten neurotoksisuuteen tai immunotoksisuuteen (katso 21 kohta). Näille eläimille ei tarvitse tehdä ruumiinavausta eikä jäljempänä olevissa kohdissa kuvattuja toimenpiteitä. Erityisvalvonnassa olevien eläinten ruumiinavauksen tarve määräytyy tapauskohtaisesti tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella.

([1]) Ruokinnan siirtämistä yön yli suositellaan monissa seerumi- ja plasmamittauksissa, etenkin glukoosimittauksissa. Tärkein syy tälle suositukselle on se, että syöminen väistämättä lisää vaihtelua, mikä voi estää lievien vaikutusten havaitsemisen ja vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Toisaalta ruokinnan siirtäminen yön yli voi häiritä eläinten yleistä metaboliaa ja etenkin ruokintatutkimuksissa häiritä päivittäistä altistusta testikemikaalille. Kaikki eläimet on arvioitava samassa fysiologisessa tilassa, ja yksityiskohtaiset tai neurologiset arvioinnit on mieluiten tehtävä eri päivänä kuin näytteenotto kliinistä biokemiaa varten.

▼**M4**

48. Elinten painotiedot on kerättävä kaikilta eläimiltä lukuun ottamatta 47 kohdan jälkimmäisessä osassa lueteltuja eläimiä. Lisämunuaiset, aivot, lisäkivekset, sydän, munuaiset, maksa, munasarjat, perna, kivekset ja kilpirauhanen (punnittava kiinnityksen jälkeen lisäkilpirauhasten kanssa) on puhdistettava niihin kiinnittyvistä kudoksista tarkoituksenmukaisella tavalla, ja elinten märkäpaino on punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi.

49. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (40) (hakasulkeissa olevat kudokset ovat valinnaisia):

Kaikki suuret leesiot	Sydän	Haima	Maha (etumaha, rauhasmaha)
Lisämunuainen	Sykkyräsuoli	Lisäkilpirauhanen	[Hampaat]
Aortta	Tyhjäsuoli	Ääreishermo	Kivekset
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Munuaiset	Aivolisäke	Kateenkorva
Umpisuoli	Kyynelrauhanen (silmän ulkopuolelta)	Eturauhanen	Kilpirauhanen
Kohdunkaula	Maksa	Peräsuoli	[Kieli]
Eturauhasen etuosa	Keuhkot	Sylkirauhanen	Henkitorvi
Paksusuoli	Imusolmukkeet (pinnalliset ja syvät)	Rakkularauhanen	Virtsarakko
Pohjukaissuoli	Rintarauhanen (pakollinen naarailla; mikäli selvästi dissekoitavissa, myös uroksilla)	Luurankolihas	Kohtu (mukaan luettuna kohdunkaula)
Lisäkivekset	[Ylähengitystiet, mukaan luettuina nenä, kuorikot ja sivuontelot]	Iho	[Virtsanjohdin]
Silmä (mukaan luettuna verkkokalvo)	Ruokatorvi	Selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)	[Virtsaputki]
[Reisiluu ja nivel]	[Hajurauhanen]	Perna	Vagina
Sappirakko (muut lajit kuin rotta)	Munasarjat	[Rintalasta]	Osa luuydintä ja/tai tuore luuydinaspiraatti
Harderin rauhaset			

▼M4

Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on säilytettävä. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköiset kohde-elimet on säilytettävä. Tutkimuksissa, joissa altistus tapahtuu ihon kautta, on säilytettävä ne elimet, jotka on lueteltu suun kautta altistuksen yhteydessä. On oleellista, että näyte otetaan nimenomaan siitä kohdasta ihoa, johon testikemikaalia on annosteltu, ja että kyseinen ihokohta säilytetään. Hengitysteiden kautta altistusta koskevien tutkimusten yhteydessä hengityselimistön säilytettävien ja tutkittavien kudosten luettelon osalta on noudatettava tämän liitteen luvussa B.8 (9) ja luvussa B.29 (10) annettuja suosituksia. Muiden elinten/kudosten osalta (ja hengityselimistöstä otettujen kudosten lisäksi) on tutkittava ne elimet, jotka on mainittu suun kautta altistuksen yhteydessä esitetyssä luettelossa.

Histopatologia

50. Toksikologis-patologisten tutkimusten toteuttamisen parhaista käytännöistä on saatavana ohjeistusta (40). Vähintään seuraavat histopatologiset tutkimukset on tehtävä:

— kaikki kudokset suuren annoksen ryhmästä ja verrokkiryhmästä

— kaikki kudokset tutkimuksen aikana kuolleilta tai lopetetuilta eläimiltä

— kaikki kudokset, joissa on makroskooppisia poikkeavuuksia

— kohdekudokset tai kudokset, joissa oli käsittelyyn liittyviä muutoksia suuren annoksen ryhmässä; kaikilta eläimiltä kaikissa muissa annosryhmissä

— parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on tutkittava.

HAVAINNOT (KARSINOGEENISUUSVAIHE)

51. Kaikki eläimet on tutkittava sairastuvuuden tai kuolleisuuden havaitsemiseksi yleensä jokaisen päivän aamulla ja illalla myös viikonloppuisin ja lomien aikana. Lisäksi eläimet on tutkittava kerran päivässä tiettyjen, toksikologisesti oleellisten merkkien havaitsemiseksi. Tutkimuksissa, joissa käytetään ruokintaletkua, eläimet on tutkittava heti annostelun jälkeen. Erityistä huomiota on kiinnitettävä kasvainten kehittymiseen. Jokaisen paljain silmin tai käsin tunnustelemalla havaittavissa olevan kasvaimen toteamisaika, paikka, koko, ulkonäkö ja kehitys on kirjattava.

52. Kaikki eläimet on punnittava käsittelyn alussa, vähintään kerran viikossa ensimmäisen 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Ravinnon kulutus ja painon lisäys on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Veden kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuussa, kun testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna. Veden kulutuksen mittaamista on harkittava myös sellaisissa tutkimuksissa, joissa eläimen juomistottumukset muuttuvat.

▼M4

Hematologia, kliininen biokemia ja muut mittaukset

53. Jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa erityisesti vaikutustapaa koskevia pohdintoja varten, eläimiltä voidaan ottaa tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella verinäytteet hematologisia ja kliinis-biokemiallisia määrityksiä varten. Myös virtsa-analyysi voi olla tarpeen. Näistä parametreista saadaan tietoa tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa, joka kestää yleensä 12 kuukautta (34 kohta), käytettyjä eläimiä koskevien tietojen perusteella. Lisätietoa tällaisten näytteiden ottamisen hyödyllisyydestä osana karsinogeenisuustutkimusta on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Jos verinäytteitä otetaan, ne on kerättävä testijakson lopussa vähän ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Verinäytteet on otettava nimetystä paikasta, esimerkiksi sydänpunktiolla tai silmäntakaisesta laskimopunoksesta anestesiassa. Verinäytteet voidaan valmistella myös tutkimusta varten etenkin, jos kohde-elin vaikuttaa olevan luuydin, joskin verinäytteiden tutkimisen arvoa mahdollisen karsinogeenisuuden/onkogeenisuuden arvioinnissa karsinogeenisuusvaiheen yhteydessä on pidetty kyseenalaisena (38).

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

54. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille paitsi erityisvalvonnassa oleville eläimille (katso 20 kohta) on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Erityisvalvonnassa olevien eläinten ruumiinavauksen tarve määräytyy tapauskohtaisesti tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella. Yleensä elinten painot eivät kuulu karsinogeenisuutta käsittelevään tutkimukseen, koska geriatriset muutokset ja myöhemmissä vaiheissa kasvainten kehittyminen mitätöi elinten painoa koskevien tietojen käyttökelpoisuuden. Nämä tiedot voivat kuitenkin olla erittäin tärkeitä näyttöön perustuvan arvioinnin toteuttamisessa ja etenkin vaikutustapaa koskevissa pohdinnoissa. Jos ne ovat osa satelliittitutkimusta, ne on kerättävä viimeistään vuoden kuluttua tutkimuksen aloittamisesta.

55. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (40) (hakasulkeissa olevat kudokset ovat valinnaisia):

Kaikki suuret leesiot	Sydän	Haima	Maha (etumaha, rauhasmaha)
Lisämunuainen	Sykkyräsuoli	Lisäkilpirauhanen	[Hampaat]
Aortta	Tyhjäsuoli	Ääreishermo	Kivekset
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Munuaiset	Aivolisäke	Kateenkorva
Umpisuoli	Kyynelrauha-nen (silmän ulkopuolelta)	Eturauhanen	Kilpirauhanen
Kohdunkaula	Maksa	Peräsuoli	[Kieli]
Eturauhasen etuosa	Keuhkot	Sylkirauhanen	Henkitorvi
Paksusuoli	Imusolmukkeet (pinnalliset ja syvät)	Rakkularauhanen	Virtsarakko

▼M4

Pohjukaissuoli	Rintarauhanen (pakollinen naarailla; mikäli selvästi dissekoitavissa, myös uroksilla)	Luurankolihas	Kohtu (mukaan luettuna kohdunkaula)
Lisäkivekset	[Ylähengitystiet, mukaan luettuina nenä, kuorikot ja sivuontelot]	Iho	[Virtsanjohdin]
Silmä (mukaan luettuna verkkokalvo)	Ruokatorvi	Selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)	[Virtsaputki]
[Reisiluu ja nivel]	[Hajurauhanen]	Perna	Vagina
Sappirakko (muut lajit kuin rotta)	Munasarjat	[Rintalasta]	Osa luuydintä ja/tai tuore luuydinaspiraatti
Harderin rauhaset			

Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on säilytettävä. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös elimet, joita pidetään testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköisinä kohde-eliminä, on säilytettävä. Tutkimuksissa, joissa altistus tapahtuu ihon kautta, on säilytettävä ne elimet, jotka on lueteltu suun kautta altistuksen yhteydessä. On oleellista, että näyte otetaan nimenomaan siitä kohdasta ihoa, johon testikemikaalia on annosteltu, ja että kyseinen ihokohta säilytetään. Hengityksen kautta altistuksen yhteydessä hengityselimistön säilytettyjen ja tutkittujen kudosten luettelon osalta on noudatettava tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9). Muiden elinten/kudosten osalta (ja hengityselimistöstä otettujen kudosten lisäksi) on tutkittava ne elimet, jotka on mainittu suun kautta altistuksen yhteydessä esitetyssä luettelossa.

Histopatologia

56. Toksikologis-patologisten tutkimusten toteuttamisen parhaista käytännöistä on saatavana ohjeistusta (40). Vähintään seuraavat kudokset on tutkittava:

— Kaikki kudokset suuren annoksen ryhmästä ja verrokkiryhmästä

— Kaikki kudokset tutkimuksen aikana kuolleilta tai lopetetuilta eläimiltä

— Kaikki kudokset, joissa on makroskooppisia poikkeavuuksia

— Jos suuren annoksen ryhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä histopatologisia muutoksia, samat kudokset on tutkittava kaikilta eläimiltä kaikissa muissa annosryhmissä.

— Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on tutkittava.

▼**M4**

TIEDOT JA RAPORTOINTI (KARSINOGEENISUUS JA KROONINEN MYRKYLLISYYS)

Tiedot

57. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava tiedot kaikista arvioiduista parametreista. Yhteenveto tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin testiryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, testin aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, merkkejä myrkyllisyydestä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen myrkyllisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin. Yhteenvetotaulukoissa on ilmoitettava keskiarvot ja keskihajonnat (jatkuvan testin tietojen osalta) niistä eläimistä, joilla ilmeni myrkyllisiä vaikutuksia tai vaurioita. Myös vaurioiden vaikeusaste on ilmoitettava.

58. Aiemmista vertailutiedoista voi olla apua tutkimuksen tulosten tulkinnassa esimerkiksi silloin, kun näyttää siltä, että samanaikaisista verrokeista saadut tiedot ovat merkittävästi erilaisia verrattuna saman testilaitoksen/kolonian verrokkieläimiltä saatuihin uudempiin tietoihin. Jos aiempia tietoja arvioidaan, niiden on oltava peräisin samasta laboratoriosta ja liityttävä eläimiin, jotka ovat samanikäisiä ja sellaisesta kannasta, joka on tuotettu kyseistä tutkimusta edeltäneen viiden vuoden aikana.

59. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Tilastolliset menetelmät ja analysoitavat tiedot on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa (9 kohta). Valinnassa on otettava huomioon myös eloonjäämistä koskevat korjaukset, mikäli tarpeen.

60. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot

— kemikaalin lähde

— eränumero

— todistus kemiallisesta analyysista.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty laji/kanta ja perustelut niiden valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli testin alussa

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

▼**M4**

Testiolosuhteet:

— antoreitin ja annoksen valinnan perustelut

— tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset menetelmät tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta / ravintovalmisteesta

— analyysitiedot valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta sekä sen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

— antoreitti ja yksityiskohdat testikemikaalin annostelusta

— inhalaatiotutkimuksissa tieto siitä, käytettiinkö vain nasaalista altistusta vai koko kehoon kohdistuvaa altistusta

— todelliset annokset (mg painokiloa kohti päivässä) ja muuntokerroin, jolla ravintovalmisteen/juomaveden testikemikaalipitoisuus (mg/kg tai ppm) muunnetaan todelliseksi annokseksi, mikäli tarpeen

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Tulokset (tiedot on esitettävä yhteenvetotaulukossa ja jokaisesta eläimestä erikseen):

Yleiset tiedot

— eloonjäämistä koskevat tiedot

— ruumiinpaino / ruumiinpainon muutokset

— ravinnon kulutus, ruumiinpainon lisäystä koskeva laskelmat sekä veden kulutus tarvittaessa

— toksikokineettiset tiedot, jos saatavilla

— silmätutkimuksen tiedot (jos saatavilla)

— hematologiset tiedot (jos saatavilla)

— kliinis-biokemialliset tiedot (jos saatavilla).

Kliiniset löydökset

— myrkyllisyyden merkit

— kaikkien poikkeavuuksien ilmaantuvuus (ja vaikeusaste, jos pisteytetty)

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta).

Ruumiinavaustiedot

— eläimen paino testin lopussa

— elinten painot (ja niiden suhteet tarvittaessa)

— ruumiinavauslöydökset, poikkeavuuksien ilmaantuvuus ja vaikeusaste.

Histopatologia

— muut kuin neoplastiset histopatologiset löydökset

— neoplastiset histopatologiset löydökset

▼M4

— makroskooppisten ja mikroskooppisten löydösten välinen korrelaatio

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista käsittelyyn liittyvistä histopatologisista löydöksistä sekä niiden vaikeusaste

— raportti objektilasien vertaisarvioinnista.

Tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa

Tulosten pohdinta, mukaan luettuina seuraavat seikat:

— mallintamistapoja koskeva pohdinta

— annos-vastesuhteet

— aiemmat vertailutiedot

— vaikutustapaa koskeviin tietoihin liittyvä pohdinta

— BMD-, NOAEL- tai LOAEL-arvojen määritykset

— merkitys ihmisten kannalta.

Päätelmät

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208

4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.

5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

6) Tämän liitteen luku B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä).

7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Tämän liitteen luku B.8. (Subakuutti myrkyllisyys hengitettynä: 28 päivän tutkimus)

10) Tämän liitteen luku B.29 (Subkrooninen myrkyllisyys hengitettynä: 90 päivän tutkimus)

11) Tämän liitteen luku B.9 (Toistetun annoksen (28 päivää) myrkyllisyys (ihon kautta nautittavat aineet)).

▼M4

12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.

13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.

14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51–56.

15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591–653.

16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1–7.

17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9–35.

18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37–68.

19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69–98.

20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF&Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. S. 279–284.

26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196–1203.

▼M4

27) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta, EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33.

28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06–9.

30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15–23.

32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60,

33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691–704.

35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam.&Appl. Toxicol. 29: 198–201.

39) EMEA (draft) document ”Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity” (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼B

B.34. **MYRKKYJEN VAIKUTUS LISÄÄNTYMISKYKYYN (YHDEN SUKUPOLVEN TESTI)**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Testattavaa ainetta annetaan erisuuruisina annoksina useille uros- ja naarasryhmille. Urokset altistetaan kasvuaikana ja ainakin yhden täydellisen spermatogeneesisyklin ajan (noin 56 päivää hiirellä ja 70 päivää rotalla), jotta voidaan todeta testattavan aineen mahdolliset haittavaikutukset siemennesteen tuottoon.

Parentaalipolven (P) naaraat on altistettava vähintään kahden estrussyklin ajan, jotta voidaan todeta testattavan aineen mahdolliset haittavaikutukset estrukseen. Sen jälkeen eläimet pariutetaan. Pariuttamisaikana testattavaa ainetta annetaan kummallekin sukupuolelle ja sen jälkeen tiineyden ja imetyksen aikana ainoastaan naaraille. Testausmenetelmää on muunneltava, jos altistus tapahtuu hengitysteiden kautta.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

Ennen tutkimuksen aloittamista nuoret, terveet eläimet jaetaan satunnaisesti koe- ja kontrolliryhmiin. Eläimet siirretään koetiloihin ja kokeen aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen kokeen alkua. Testattavaa ainetta suositellaan annettavaksi ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna. Myös muita antotapoja voidaan käyttää. Samaa antotapaa on käytettävä kaikille koe-eläimille koko koeajan. Jos liuotinta tai muita lisäaineita käytetään annostelun helpottamiseksi, niiden myrkyttömyys on oltava tiedossa. Eläimet on altistettava viikon jokaisena päivänä.

▼B

Koe-eläimet

Eläinlajin valinta

Suositeltavimmat lajit ovat rotta tai hiiri. Koe-eläiminä on käytettävä terveitä eläimiä, joilla ei ole tehty aikaisempia kokeita. Kantoja, joiden hedelmällisyys on alhainen, ei saa käyttää. Koe-eläinten laji, kanta, sukupuoli, paino ja/tai ikä on oltava tiedossa.

Hedelmällisyysmäärityksiä tehtäessä tutkitaan sekä urokset että naaraat. Kaikki koe- ja kontrollieläimet on vieroitettava ennen altistuksen alkamista.

Lukumäärä ja sukupuoli

Kussakin koe- ja kontrolliryhmässä on oltava niin monta eläintä, että tutkimukseen saadaan noin 20 kantavaa naarasta, joiden tiineys on päättymässä.

Tarkoituksena on tuottaa niin monta tiineyttä ja poikuetta, että testattavan aineen mahdollisista vaikutuksista P-sukupolven eläinten hedelmällisyyteen, tiineyteen ja emon käyttäytymiseen sekä F_1-sukupolven imeväisvaiheeseen, kasvuun ja kehitykseen syntymästä vieroitukseen voidaan tehdä luotettava arviointi.

Koe-olosuhteet

Ravintoa ja vettä on oltava vapaasti saatavilla. Synnytyksen lähestyessä kantavat naaraat tulee sijoittaa yksitellen synnytyshäkkeihin, joihin voidaan laittaa pesäntekotarvikkeita.

Annostasot

Testissä käytetään vähintään kolmea annostasoa ja kontrolliryhmää. Jos aineen annostelussa käytetään liuotinta, kontrolleille annostellaan liuotinta suurimman annoksen saavalle ryhmälle annettu määrä. Jos testattava aine vähentää ravinnon tarvetta tai hyväksikäyttöä, tutkimukseen voidaan liittää ravintokontrolliryhmä. Elleivät testattavasta aineesta johtuvat fysikaalis-kemialliset tai biologiset vaikutukset aiheuta rajoituksia, suurimman annoksen on aiheutettava parentaalisukupolvessa myrkkyvaikutuksia mutta ei kuolleisuutta. Keskimmäisen annostason(tasojen) on aiheutettava testattavan aineen pienimmät havaittavissa olevat myrkkyvaikutukset eikä pienimmällä annoksella saa olla havaittavia haittavaikutuksia kumpaankaan sukupolveen. Kun annos annetaan kapseleina tai ruokintaletkulla, se tulee määrittää kunkin eläimen painon perusteella ja säätää viikoittain painon muutosten mukaan. Kantavien naaraiden annos voidaan myös määrittää naaraan painon perusteella tiineyden 0-päivänä ja 6. päivänä.

Raja-annostesti

Jos lievästi myrkyllisiä aineita tutkittaessa 1 000 mg/kg ei vaikuta lisääntymiskykyyn, muita annostasoja ei tarvitse tutkia. Mikäli suurimmalla annoksella tehty esitesti aiheuttaa emossa selviä myrkkyvaikutuksia, mutta ei vaikuta hedelmällisyyteen, muita annostasoja ei ole tarpeen tutkia.

▼B

Testin suorittaminen

Testin aikataulu

Parentaalipolven (P) urosten päivittäinen altistus on aloitettava vieroituksen jälkeen 5–9 viikon iässä ja vähintään viiden vuorokauden koeolosuhteisiin sopeuttamisen jälkeen. Rottia altistetaan 10 viikkoa ennen pariuttamisaikaa (hiiriä kahdeksan viikkoa). Urokset lopetetaan ja tutkitaan pariuttamisajan kuluttua. Vaihtoehtoisesti ne voidaan pitää testin ruokavaliolla mahdollisen toisen poikueen tuottamista varten. Tällöin ne lopetetaan ja tutkitaan jossakin vaiheessa ennen tutkimuksen päättymistä. Parentaalipolven (P) naaraiden altistuksen on alettava vähintään viiden vuorokauden sopeutumisajan kuluttua ja jatkuttava ainakin kahden viikon ajan ennen pariutumista. P-naaraiden päivittäisen altistuksen on jatkuttava koko kolmen viikon pariuttamisajan ja tiineysajan aina F_1-poikasten vieroitukseen asti. Altistusaikataulun muutoksia voidaan harkita testattavasta aineesta saatavilla olevien tietojen, kuten metabolisten vaikutusten tai biokertyvyyden perusteella.

Pariuttamismenettely

Tutkittaessa myrkkyjen vaikutusta hedelmällisyyteen voidaan eläimet pariuttaa joko 1:1 (yksi uros yhtä naarasta kohden) tai 1:2 (yksi uros kahta naarasta kohden).

Kun pariutetaan 1:1, yhtä naarasta pidetään saman uroksen luona kunnes tiineys alkaa tai kolme viikkoa on kulunut. Naaraat on tutkittava joka aamu sperman tai emätintulpan havaitsemiseksi. Sperman tai emätintulpan toteamispäivä on tiineyden 0-päivä.

Pariutumattomat parit tutkitaan näennäisen lisääntymiskyvyttömyyden selvittämiseksi.

Näihin tutkimuksiin voi kuulua uuden pariutumismahdollisuuden järjestäminen toisen hedelmällisen naaraan tai uroksen kanssa, sukupuolielinten mikroskooppinen tutkimus ja estrussyklin sekä siemennestetuotannon tutkiminen.

Poikueiden koko

Lisääntymiskykytutkimuksen kuluessa altistettujen eläinten annetaan synnyttää normaalisti ja hoitaa poikueensa vieroitukseen asti ilman, että poikueita yhtenäistetään.

Jos poikueet yhtenäistetään, seuraavaa menetelmää suositellaan käytettäväksi. Syntymän jälkeen 1-4 päivän välisenä aikana poikuetta voidaan mukauttaa poistamalla liiat poikaset niin, että poikueeseen jää, jos mahdollista, neljä urosta ja neljä naarasta.

Silloin kun uros- tai naaraspuolisten poikasten määrä on sellainen, että poikueeseen ei jää neljää poikasta kumpaakin sukupuolta, voidaan tehdä osittaismukautus (esimerkiksi viisi urosta ja kolme naarasta). Alle kahdeksan poikasen poikueita ei mukauteta.

▼B

Eläinten tarkkailu

Kaikkien eläinten tarkkailu suoritetaan vähintään kerran päivässä koko tutkimuksen ajan. Käyttäytymistavan muutokset, vaikeat tai pitkittyneet synnytysoireet ja kaikki myrkkyoireet sekä kuolleisuus on kirjattava. Ennen pariutumista ja pariutumisajan kuluessa ravinnon kulutus voidaan mitata päivittäin. Synnytyksen jälkeinen ja imetyksen aikainen ravinnon kulutus (ja veden kulutus kun testattava aine annetaan juomavedessä) mitataan samana päivänä kun poikue punnitaan. P-urokset ja P-naaraat on punnittava ensimmäisenä altistuspäivänä ja sen jälkeen viikoittain. Nämä huomiot on kirjattava jokaisesta täysikasvuisesta koe-eläimestä erikseen.

Tiineysajan pituus on laskettava tiineyden 0-päivästä. Kukin poikue on tutkittava mahdollisimman pian synnytyksen jälkeen sekä kirjattava poikasten lukumäärä ja sukupuoli, kuolleena syntyneet, elävänä syntyneet ja paljain silmin havaittavat poikkeavuudet.

Kuolleet ja neljäntenä päivänä lopetetut poikaset säilytetään ja tutkitaan poikkeavuuksien havaitsemiseksi. Elävät poikaset lasketaan ja poikue punnitaan synnytystä seuraavana aamuna sekä neljäntenä ja seitsemäntenä päivänä ja sen jälkeen viikoittain tutkimuksen päättymiseen saakka, jolloin eläimet punnitaan yksitellen.

Emojen ja poikasten fyysiset poikkeavuudet ja käyttäytymishäiriöt kirjataan.

Patologia

Ruumiinavaus

Tutkimuksen kuluessa kuolleet tai lopetetut P-sukupolven eläimet tutkitaan mikroskooppisesti rakenteellisten poikkeavuuksien tai patologisten muutosten toteamiseksi. Huomiota kiinnitetään erityisesti sukupuolielimiin. Kuolleet tai huonokuntoiset poikaset tutkitaan poikkeavuuksien toteamiseksi.

Histopatologia

Kaikkien P-eläinten munasarjat, kohtu, kohdunkaula, emätin, kivekset, lisäkivekset, rakkularauhaset, eturauhanen, koagulaatiorauhanen, aivolisäke ja kohde-elimet on säilytettävä mikroskooppista tutkimusta varten. Ellei niitä ole tutkittu muissa moniannostutkimuksissa, ne on tutkittava mikroskooppisesti kaikkien suurimman annoksen saaneiden ja kontrolleläinten osalta sekä, mikäli mahdollista, tutkimuksen aikana kuolleiden eläinten osalta.

Elimet, joissa näillä eläimillä esiintyy poikkeavuuksia, on myös tutkittava kaikkien muiden P-eläinten osalta. Näissä tapauksissa on kaikki näkyviä patologisia muutoksia osoittavat kudokset tutkittava mikroskooppisesti. Kuten pariuttamismenettelyä selostavassa kohdassa esitetään, lisääntymiskyvyttömiksi epäiltyjen eläinten sukupuolielimet voidaan tutkia mikroskooppisesti.

▼B

2. **TULOKSET**

Tulokset voidaan esittää taulukkomuodossa, josta ilmenevät kuhunkin koeryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa, hedelmällisten urosten määrä, kantavien naaraiden määrä, muutosten laatu ja eläinten prosentuaalinen osuus kutakin muutosta kohden.

Jos mahdollista, tulosten merkitsevyys on arvioitava jotakin tilastollista menetelmää käyttäen. Kaikki tunnetut tilastointimenetelmät ovat sallittuja.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— koe-eläinlaji/kanta,

— myrkkyvaikutukset sukupuolen ja annostason perusteella sekä hedelmällisyys, tiineys ja elinkelpoisuus,

— eläinten kuolinaika tutkimuksen kuluessa ja elossa olevat ennen lopetusajankohtaa tai tutkimuksen päättyessä,

— taulukko, josta ilmenee kunkin poikueen paino, poikasten keskipaino ja kunkin poikasen paino tutkimuksen päättyessä,

— lisääntymistä, poikasia ja syntymän jälkeistä kasvua koskevat myrkky- ja muut vaikutukset,

— kunkin oireen toteamispäivä ja kehittyminen,

— P-eläinten painoa koskevat tiedot,

— ruumiinavauslöydökset,

— tarkka selostus kaikista mikroskooppilöydöksistä,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼B

B.35. KAKSI SUKUPOLVEA KÄSITTÄVÄ LISÄÄNTYMISKYKYYN KOHDISTUVIEN MYRKYLLISYYSVAIKUTUSTEN TUTKIMUS

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD: n testiohjeesta nro 416 (2001).

1.1 JOHDANTO

Tällä kaksi sukupolvea käsittävällä reproduktiotestillä on tarkoitus tuottaa yleistä tietoa testiaineen vaikutuksista urosten ja naaraiden lisääntymiselinten vahingoittumattomuuteen ja toimintaan. Siihen sisältyy sukupuolirauhasten toiminta, kiimasykli, pariutumiskäyttäytyminen, hedelmöityminen, tiineys, synnytys, imetys ja vieroitus sekä testiaineen vaikutukset jälkeläisten kasvuun ja kehitykseen. Tutkimus voi myös tuottaa tietoja testiaineen vaikutuksista vastasyntyneiden sairastuvuuteen ja kuolleisuuteen sekä alustavia tietoja pre- ja postnataalisen kehityksen aikaisista myrkyllisyysvaikutuksista. Tutkimus voi lisäksi ohjata seuraavien tutkimusten suorittamista. F1-sukupolven kasvun ja kehityksen lisäksi tämän testimenetelmän tarkoitus on arvioida F2-sukupolven urosten ja naaraiden lisääntymiselinten vahingoittumattomuutta ja toimintaa sekä kasvua ja kehitystä. Lisätietoja kehityksen aikaisista myrkyllisyysvaikutuksista ja toiminnallisista häiriöistä voidaan hankkia lisäämällä tässä kuvattuun tutkimusohjelmaan muita osatutkimuksia, joissa sovelletaan yleiseen ja/tai hermojen kehitykseen kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten tutkimusmenetelmiä, tai tutkimalla näitä loppupisteitä erillisillä testeillä soveltuvia testimenetelmiä käyttäen.

1.2 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta annetaan porrastettuina annoksina useille uros- ja naarasryhmille. P-sukupolven uroksille tulee antaa testiainetta niiden kasvun aikana ja ainakin yhden kokonaisen spermatogeneesisyklin ajan (hiirellä noin 56 päivää ja rotalla 70 päivää), jotta spermatogeneesiin kohdistuvat haittavaikutukset voidaan todeta. Spermaan kohdistuvat vaikutukset määritetään useiden spermaparametrien (esimerkiksi siittiöiden morfologia ja liikkuvuus), kudospreparaattien ja yksityiskohtaisen histopatologisen tutkimuksen avulla. Jos käytettävissä on spermatogeneesiä koskevia tietoja aikaisemmasta toistuvaa annostelua käyttäneestä tutkimuksesta, jonka kesto on riittävä, esimerkiksi 90 päivää, P-sukupolven uroksia ei tarvitse sisällyttää arviointiin. On kuitenkin suositeltavaa säilyttää P-sukupolven spermanäytteet tai digitaaliset tallenteet myöhempää arviointia varten. P-sukupolven naaraille tulee antaa testiainetta niiden kasvun aikana ja useiden kokonaisten kiimasyklien ajan, jotta testiaineen mahdolliset normaalia kiimasykliä häiritsevät haittavaikutukset voidaan todeta. Testiainetta annetaan poikasten vanhemmille (P-sukupolvi) pariutumisen aikana, tiineyden aikana ja niiden F1-poikasten vieroitukseen asti. Vieroituksesta lähtien ainetta annetaan F1-poikasille aikana, jolloin ne kehittyvät sukukypsiksi, pariutumisen aikana sekä F2-sukupolven syntymän jälkeen vieroitukseen asti.

Kaikista eläimistä tutkitaan myrkyllisyysvaikutusten merkit kliinisesti havainnoiden ja patologisten tutkimusten avulla kiinnittäen erityistä huomiota urosten ja naaraiden lisääntymiselinten vahingoittumattomuuteen ja toimintaan sekä jälkeläisten kasvuun ja kehitykseen kohdistuviin vaikutuksiin.

▼B

1.3 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.3.1 **Eläinlajin valinta**

Suositeltava eläinlaji on rotta. Jos käytetään muita lajeja, niiden käyttö on erikseen perusteltava ja testimenetelmää on tarvittaessa mukautettava. Kantoja, joiden hedelmällisyys on alhainen tai joilla tiedetään esiintyvän kehityshäiriöitä, ei tule käyttää. Tutkimuksen alussa eläinten painon variaation tulisi olla mahdollisimman pieni, eikä se saa olla suurempi kuin 20 % kummankin sukupuolen painokeskiarvosta.

1.3.2 **Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta**

Koe-eläinhuoneen lämpötilan olisi oltava 22 ºC (± 3º). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 % eikä mielellään ylitä 70 %:a muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50-60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion valinnassa on varmistettava, että testiaineen ja ravinnon suhde on sopiva, mikäli testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna.

Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Parituksen tulee tapahtua tarkoitukseen sopivissa häkeissä. Kun parituksen voidaan todeta tapahtuneen, kukin pariutunut naaras siirretään omaan synnytys- tai poikimishäkkiinsä. Paritetut rotat voidaan myös pitää häkeissä pienissä ryhmissä ja erottaa toisistaan yksi tai kaksi päivää ennen synnytystä. Paritetuille eläimille on annettava synnytyksen lähestyessä asianmukaiset ja etukäteen määritellyt pesäntekoaineet.

1.3.3 **Eläinten valmistelu**

Testissä tulee käyttää terveitä, nuoria eläimiä, jotka on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden vuorokauden ajan ja joita ei ole aiemmin käytetty testeihin. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja/tai ikä on tunnettava. Mahdollisista sisarussuhteista eläinten välillä on oltava selvillä, jotta sisarusten parittaminen voidaan välttää. Eläimet jaetaan satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmään (jaottelu ruumiinpainon mukaan on suositeltavaa). Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Kullekin eläimelle annetaan oma tunnistenumero. P-sukupolvelle on annettava tunnistenumerot ennen annostelun aloittamista. F1-sukupolvelle tunnistenumerot annetaan paritukseen valittujen eläinten vieroituksen yhteydessä. F1-sukupolven kaikkien valittujen eläinten alkuperäispoikue on merkittävä muistiin. Lisäksi suositellaan, että poikasille annetaan yksilöllinen tunniste mahdollisimman pian syntymän jälkeen, mikäli yksilöt aiotaan punnita tai mikäli niille aiotaan tehdä toiminnallisia testejä.

P-sukupolven eläinten tulee olla käsittelyn alkaessa noin 5-9 viikon ikäisiä. Eläinten tulee kaikissa testiryhmissä olla samanpainoisia ja -ikäisiä niin tarkasti kuin on käytännössä mahdollista.

▼B

1.4 TESTIN SUORITUS

1.4.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Kussakin testi- ja kontrolliryhmässä on oltava riittävä määrä eläimiä, jotta testiin saadaan mielellään vähintään 20 tiinettä naarasta, jotka synnyttävät tai joiden synnytysaika on lähellä. Tämä ei ehkä ole mahdollista testattaessa aineita, jotka aiheuttavat käsittelyyn liittyviä ei-toivottuja vaikutuksia (esimerkiksi steriiliys tai liian suuri myrkyllisyys ylimmällä annostasolla). Tavoitteena on tuottaa tarpeeksi tiineystapauksia, jotta voidaan tehdä merkitsevä arvio testiaineen vaikutuksesta hedelmällisyyteen, tiineyteen, emon käytökseen ja imetykseen, F1-sukupolven poikasten kasvuun ja kehitykseen hedelmöityksestä sukukypsyyteen, sekä F1-sukupolven poikasten (F2) kehitykseen vieroitukseen asti. Jos tutkimuksessa ei päästä tavoiteltuun tiineiden eläinten määrään (20), tutkimus ei silti välttämättä ole epävalidi. Tutkimuksen validiteetti tulee arvioida kussakin tapauksessa erikseen.

1.4.2 **Annosten valmistelu**

Testiaineen antaminen suun kautta (ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna tai letkulla) on suositeltavaa, paitsi jos jokin muu antotapa (esimerkiksi ihoapplikaatio tai inhalaatio) todetaan sopivammaksi.

Tarvittaessa testiaine liuotetaan tai siitä tehdään suspensio sopivaan kantaja-aineeseen. Ensiksi tulisi aina harkita vesiliuoksen/suspension käyttämistä, milloin se on mahdollista, seuraavaksi öljyliuoksen/-emulsion (esimerkiksi maissiöljy) käyttämistä ja vasta sitten muiden kantaja-aineiden käyttämistä. Jos kantaja-aineena käytetään muuta kuin vettä, kantaja-aineen toksiset ominaisuudet on tunnettava. Testiaineen stabiilius kantaja-aineessa on määritettävä.

1.4.3 **Annostasot**

Testissä tulee käyttää vähintään kolmea annostasoa ja testin kanssa samaan aikaan tehtävää kontrollia. Jos testiaineen fysikaalinen/-kemiallinen olomuoto tai biologiset ominaisuudet eivät aseta rajoituksia, suurin annos valitaan sellaiseksi, että se aiheuttaa myrkyllisyysvaikutuksen mutta ei aiheuta kuolemaa tai kovia tuskia. Mikäli odottamatonta kuolleisuutta esiintyy, hyväksyttävä on yleensä sellainen tutkimus, jossa P-sukupolven kuolleisuus on alle 10 %. Annostasot on porrastettava laskevasti siten, että tutkimuksessa saadaan esiin mahdolliset annostasoihin liittyvät vaikutukset sekä haitaton altistustaso (NOAEL). Kaksinkertaiset-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi yli kymmenkertaisia annosvälejä). Tutkimuksissa, joissa testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna, annostasojen väliset erot saavat olla enintään kolminkertaisia. Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon aikaisemmat myrkyllisyystiedot ja erityisesti toistettujen annostelututkimusten tulokset. Tutkimuksessa on otettava huomioon myös tiedot testiaineen tai muiden sen kanssa samantyyppisten materiaalien metaboloitumisesta elimistössä samoin kuin niiden toksikokineettisistä ominaisuuksista. Nämä tiedot auttavat myös osoittamaan, että annostasot on valittu oikein.

▼B

Kontrolliryhmän tulee olla joko ryhmä, joka ei saa käsittelyä, tai kantaja-ainetta saava ryhmä, mikäli testiaineen antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Kontrolliryhmän eläimiä tulee käsitellä samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä (testiainekäsittelyä lukuun ottamatta). Jos käytetään kantaja-ainetta, kontrolliryhmälle tulee antaa tilavuudeltaan suurin käytetty kantaja-aineannos. Jos testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna ja se vähentää ravinnonottoa tai ravinnon hyväksikäyttöä elimistössä, voi olla tarpeen käyttää parikontrolliryhmää. Samanaikaisen parikontrolliryhmän sijasta voidaan käyttää tietoja, jotka on saatu sellaisista tutkimuksista, joilla on selvitetty vähentyneen ravinnonoton vaikutusta lisääntymisfysiologisiin parametreihin.

Kantaja-ainetta tai muuta lisäainetta käytettäessä aineesta on syytä selvittää seuraavat ominaisuudet: vaikutus testiaineen absorboitumiseen, jakautumiseen, metaboloitumiseen ja elimistössä säilymiseen, sellaiset vaikutukset testiaineen kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka saattavat muuttaa testiaineen myrkyllisyyttä, sekä vaikutukset koeeläinten ravinnon- ja juomanottoon tai ravitsemustilaan.

1.4.4 **Raja-annostesti**

Jos jokin testin annostaso, joka on vähintään 1 000 mg/kg (eläimen painokilo)/vrk tai vastaava suhteellinen määrä ravinnossa tai juomavedessä, milloin testiaine annetaan ravinnon tai juomaveden seassa, ja joka annetaan tässä testimenetelmässä kuvattujen menettelyjen mukaisesti, ei aiheuta lainkaan havaittavaa myrkyllisyysvaikutusta poikasten vanhemmissa tai poikasissa ja jos myrkyllisyysvaikutusta ei aikaisempien tutkimustulosten perusteella ole odotettavissa (esimerkiksi rakenteellisesti ja/tai metabolisesti samantyyppiset yhdisteet), täydellinen useita annostasoja käyttävä testi ei välttämättä ole tarpeen. Raja-annostestiä voidaan soveltaa, paitsi silloin, kun ihmisten altistuminen viittaa siihen, että on käytettävä suurempaa suun kautta annettavaa annosta. Muita antotapoja, kuten inhalaatiota tai ihoapplikaatiota käytettäessä, testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet, esimerkiksi liukoisuus, saattavat usein osoittaa altistuksen enimmäistason ja rajoittaa sitä.

1.4.5 **Antotapa**

Testiainetta annetaan eläimille seitsemänä päivänä viikossa. Suun kautta tapahtuva antotapa (ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna tai letkulla) on suositeltava. Jos käytetään muuta antotapaa, testin tekijän on perusteltava muun antotavan käyttö ja muutettava muita kohtia vastaavasti. Kaikille eläimille tulee antaa testiaineannokset samalla tavalla asianmukaisena koeaikana. Jos testiaine annetaan letkulla, on syytä käyttää mahaletkua. Kerralla annettavan nesteen tilavuus ei saa ylittää 1 ml/100 g eläimen painoa (maissiöljyä käytettäessä tilavuus saa olla enintään 0,4 ml/100 g eläimen painoa), paitsi käytettäessä vesiliuosta, jolloin enimmäistilavuus voi olla 2 ml/100 g eläimen painoa. Testiaineen tilavuuden vaihtelu tulee minimoida pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla voidaan käyttää tilavuudeltaan samaa nestemäärää. Poikkeuksena tästä ovat ärsyttävät tai syövyttävät aineet, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Letkuannostelua käyttävissä tutkimuksissa poikaset saavat yleensä testiainetta vain epäsuorasti emon maidosta vieroitukseen asti, jolloin annosten antaminen poikasille aloitetaan. Tutkimuksissa, joissa testiaine annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, poikaset saavat lisäksi testiainetta suoraan, kun ne alkavat itse syödä imetysajan viimeisellä viikolla.

▼B

Jos aineita annetaan eläimille ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testiainemäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Jos testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna, voidaan ilmoittaa joko testiaineen pitoisuus ravinnossa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettu annos; käytetty tapa on mainittava. Jos testiaine annetaan letkulla, annos tulee antaa päivittäin samaan aikaan ja sitä on mukautettava vähintään viikoittain siten, että annostaso pysyy samana eläimen ruumiinpainoon nähden. Näin meneteltäessä on otettava huomioon tiedot testiaineen leviämisestä istukan kautta.

1.4.6 **Testiaikataulu**

P-sukupolven urosten ja naaraiden päivittäinen käsittely aloitetaan, kun eläimet ovat 5–9 viikon ikäisiä. F1-sukupolven urosten ja naaraiden päivittäinen käsittely aloitetaan vieroituksen yhteydessä pitäen kuitenkin mielessä, että jos testiaine annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, F1-sukupolven poikaset saattavat altistua testiaineelle jo imetysaikana. Molempien sukupuolten käsittelyä jatketaan sekä P- että F1-ryhmissä ainakin kymmenen viikon ajan ennen parittamisvaihetta. Molempien sukupuolten käsittelyä jatketaan myös kahden viikon parittamisjakson aikana. Urokset lopetetaan inhimillisellä tavalla ja tutkitaan, kun niitä ei enää tarvita lisääntymisfysiologisten vaikutusten arviointiin. P-sukupolven naaraiden käsittelyä jatketaan koko tiineysajan ja F1-sukupolven poikasten vieroitukseen asti. Annosteluaikataulun mukauttamista harkittaessa tulee ottaa huomioon käytettävissä olevat tiedot testiaineesta, mukaan lukien aikaisemmat myrkyllisyystiedot sekä metaboloituminen tai biologinen kertyminen. Kunkin eläimen annos on yleensä määriteltävä eläimen viimeksi määritetyn ruumiinpainon mukaan. Annoksen mukauttamisessa viimeisen tiineyskolmanneksen aikana on kuitenkin oltava varovainen.

P- ja F1-sukupolvien urosten ja naaraiden käsittelyä jatketaan eläinten lopettamiseen asti. P- ja F1-sukupolvien kaikki aikuiset urokset ja naaraat tulee lopettaa inhimillisellä tavalla, kun eläimiä ei enää tarvita lisääntymisfysiologisten vaikutusten arviointiin. F1-sukupolven poikaset, joita ei valita paritukseen, ja kaikki F2-sukupolven poikaset lopetetaan inhimillisellä tavalla vieroituksen jälkeen.

1.4.7 **Paritus**

1.4.7.1 *P-sukupolven paritus*

Kussakin parituksessa jokainen naaras on samassa häkissä yhden, samalla annostasolla olevan uroksen kanssa (1:1-paritus) siihen saakka, kunnes eläimet parittelevat tai kunnes kaksi viikkoa on kulunut. Naaraat tutkitaan päivittäin sperman tai vaginan tulpituksen toteamiseksi. Tiineyden päivä 0 katsotaan päiväksi, jolloin jompikumpi todetaan. Jos parittelua ei tapahdu, voidaan harkita naaraan uutta paritusta saman ryhmän hedelmällisiksi todettujen urosten kanssa. Pariutuneet eläinparit on merkittävä muistiin. Sisarusten parittamista on vältettävä.

▼B

1.4.7.2 *F1 -sukupolven paritus*

F1-sukupolven eläinten paritus tapahtuu siten, että kustakin poikueesta valitaan vieroituksen yhteydessä vähintään yksi uros ja yksi naaras, jotka paritetaan samalla annostasolla olevien eri poikueeseen kuuluvien poikasten kanssa. Näin syntyvä sukupolvi on F2-sukupolvi. Poikaset valitaan kustakin poikueesta satunnaisesti, jos poikasten ruumiinpainossa tai ulkomuodossa ei ole merkittäviä eroja. Jos tällaisia eroja havaitaan, kustakin poikueesta on valittava sitä parhaiten edustavat yksilöt. Käytännössä valinta on paras tehdä ruumiinpainon perusteella, mutta se voidaan tehdä myös ulkomuodon perusteella. F1-sukupolven poikasia ei saa parittaa ennen kuin ne ovat saavuttaneet täyden sukukypsyyden.

Poikimattomien parien hedelmättömyyden todennäköinen syy on arvioitava. Menetelminä voidaan käyttää toista paritusta muiden hedelmällisiksi todettujen urosten tai naaraiden kanssa, lisääntymiselinten mikroskooppitutkimusta sekä kiimasyklien ja spermatogeneesin tutkimista.

1.4.7.3 *Toinen paritus*

Joissakin tapauksissa, esimerkiksi kun havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia poikueen koossa tai epäselviä vaikutuksia ensimmäisessä parituksessa, on suositeltavaa parittaa P- tai F1-sukupolven aikuiset eläimet uudelleen toisen poikueen tuottamiseksi. Suositeltava tapa on parittaa uudelleen naaraat tai urokset, jotka eivät ole tuottaneet poikuetta vastakkaisen sukupuolen hedelmälliseksi todetun eläimen kanssa. Jos toisen poikueen tuottamista pidetään tarpeellisena jommassakummassa sukupolvessa, eläimet on paritettava uudelleen noin viikon kuluttua viimeisen poikueen vieroituksesta.

1.4.7.4 *Poikueen koko*

Eläinten on annettava poikia normaalisti ja kasvattaa poikaset vieroitukseen asti. Poikueen koon vakioiminen ei ole välttämätöntä. Jos vakiointia käytetään, vakiointimenetelmä on kuvattava yksityiskohtaisesti.

1.5 HAVAINNOT

1.5.1 **Kliiniset havainnot**

Yleinen kliininen havainnointi on tehtävä päivittäin, ja letkuruokinnassa havainnoinnin ajoitusta suunniteltaessa on syytä ottaa huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut myrkyllisyysvaikutukset ovat suurimmillaan. Käytösmuutokset, vaikean tai pitkittyneen synnytyksen merkit ja kaikki myrkyllisyysvaikutusten merkit on kirjattava. Kukin eläin on lisäksi tutkittava yksityiskohtaisesti esimerkiksi punnituksen yhteydessä ainakin viikoittain. Kaikkia eläimiä havainnoidaan kaksi kertaa päivässä ja tarvittaessa viikonloppuisin kerran päivässä sairastuvuuden ja kuolleisuuden toteamiseksi.

▼B

1.5.2 **Poikasia saaneiden eläinten paino sekä ravinnon- ja nesteenotto**

Poikasia saaneet eläimet (P ja F1) punnitaan annostelun aloituspäivänä ja sen jälkeen ainakin kerran viikossa. Poikasia saaneet naaraat (P ja F1) punnitaan ainakin tiineyspäivinä 0, 7, 14 ja 20 tai 21 sekä imetyksen aikana poikueiden punnituspäivinä sekä eläinten lopetuspäivänä. Havainnot raportoidaan erikseen kustakin täysikasvuisesta eläimestä. Paritusta edeltävänä aikana ja tiineysjaksojen aikana ravinnonotto tulee mitata vähintään viikoittain. Juomanotto mitataan vähintään viikoittain, jos testiaine annetaan juomaveteen sekoitettuna.

1.5.3 **Kiimasykli**

Kiimasyklin pituus ja normaalius arvioidaan P- ja F1-sukupolven naaraista ottamalla vaginasta irtosolunäyte ennen pariutumista sekä haluttaessa myös pariutumisjakson aikana, kunnes pariutumisen voidaan todeta tapahtuneen. Otettaessa irtosolunäytettä vaginasta tai kohdunkaulasta on varottava limakalvojen vahingoittamista ja siitä seuraavaa valeraskautta (1).

1.5.4 **Siemennesteen muuttujat**

Lopettamisen yhteydessä kaikilta P- ja F1-uroksilta kirjataan kivesten ja lisäkivesten paino ja yksi kappale kumpaakin elintä säilötään histopatologista tutkimusta varten (katso kohdat 1.5.7 ja 1.5.8.1). Sekä P- että F1-sukupolven kustakin ryhmästä erotetaan vähintään kymmenen uroksen osajoukko, jonka lopuista kiveksistä ja lisäkiveksistä lasketaan homogenisoinnille resistentit spermatidit ja lisäkiveksen häntään varastoituneen siemennesteen määrä. Samalta osajoukolta kerätään siemenneste lisäkiveksen hännästä tai siemenjohtimesta siittiöiden liikkuvuuden ja morfologian arviointia varten. Jos havaitaan käsittelyyn liittyviä vaikutuksia tai jos muissa tutkimuksissa on osoitettu mahdollisia vaikutuksia spermatogeneesiin, jokaisen ryhmän kaikkien urosten siemenneste tulee arvioida. Muussa tapauksessa riittää, että laskenta tehdään kontrolliryhmän ja korkean annostasoryhmän P- ja F1-eläimille.

Homogenisoinnille resistenttien kiveksissä olevien spermatidien ja lisäkiveksen häntään varastoituneiden siittiöiden määrä on laskettava (2)(3). Lisäkiveksen häntään varastoituneiden siittiöiden määrä voidaan johtaa kvalitatiiviseen arviointiin käytetyn suspension sisältämien siittiöiden pitoisuudesta ja tilavuudesta sekä jäljelle jääneen lisäkiveksen hännän kudoksen jauhamisen ja/tai homogenoinnin jälkeen saadusta siittiöiden lukumäärästä. Laskenta tulee tehdä valitulle urosten osajoukolle kaikissa annosryhmissä heti eläinten lopettamisen jälkeen, paitsi jos käytetään video- tai digitaalista tallennusta tai jos näytteet jäädytetään myöhempää analyysia varten. Näissä tapauksissa kontrolliryhmät ja ylin annosryhmä voidaan analysoida ensin. Jos mitään käsittelyyn liittyviä vaikutuksia (esimerkiksi vaikutukset siittiöiden määrään, liikkuvuuteen tai morfologiaan) ei havaita, muita annosryhmiä ei tarvitse analysoida. Jos taas ylimmässä annosryhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä vaikutuksia, myös alemmat annosryhmät on arvioitava.

▼B

Lisäkiveksessä (tai siemenjohtimessa) olevien siittiöiden liikkuvuus tulee arvioida tai videoida heti eläimen lopettamisen jälkeen. Siittiöt kerätään niitä mahdollisimman vähän vaurioittaen ja sperma laimennetaan liikkuvuusanalyysia varten hyväksyttyjä menetelmiä käyttäen (4). Progressiivisesti liikkuvien siittiöiden prosenttiosuus tulee määrittää joko subjektiivisesti tai objektiivisesti. Kun tehdään tietokoneavusteinen liikkuvuusanalyysi (5) (6) (7) (8) (9) (10), progressiivinen liikkuvuus johdetaan käyttäjän määrittelemien keskimääräisten nopeuden ja suoruuden kynnysarvojen eli lineaarisen indeksin mukaan. Jos näytteet on videoitu (11) tai kuvat on muulla tavoin tallennettu ruumiinavauksen yhteydessä, jatkoanalyysi tarvitsee tehdä vain kontrolliryhmän ja ylimmän annosryhmän P- ja F1-sukupolvien uroksille. Jos kuitenkin havaitaan käsittelyyn liittyviä vaikutuksia, myös alemmat annosryhmät on arvioitava. Jos video- tai digitaalitallenteita ei ole tehty, kaikkien testiryhmien kaikki näytteet tulee analysoida ruumiinavauksen yhteydessä.

Lisäkiveksen (tai siemenjohtimen) siemennestenäytteestä tehdään morfologinen arvio. Siemenneste (vähintään 200 siittiötä/näyte) tutkitaan fiksatiivikäsiteltynä märkäpreparaattina (12) ja luokitetaan joko normaaliksi tai epänormaaliksi. Morfologisiin siemennesteen epänormaaliuksiin kuuluvat siittiöiden fuusio, eristyneet päät sekä päiden tai häntien epämuodostumat. Arviointi on tehtävä kaikista annosryhmistä valitulle urosten osajoukolle joko heti eläinten lopettamisen jälkeen tai myöhemmin video- tai digitaalitallenteiden pohjalta. Kun preparaatit on käsitelty fiksatiivilla, ne voidaan tutkia myöhemminkin. Näissä tapauksissa kontrolliryhmä ja ylin annosryhmä voidaan tutkia ensin. Jos mitään käsittelyyn liittyviä vaikutuksia (esimerkiksi vaikutuksia sperman morfologiaan) ei havaita, alempia annosryhmiä ei tarvitse analysoida. Jos käsittelyyn liittyviä vaikutuksia esiintyy ylimmässä annosryhmässä, myös alemmat annostasoryhmät on arvioitava.

Jos jokin edellä kuvatuista siemennesteen muuttujista on jo tutkittu vähintään 90 päivää kestäneissä systeemisen myrkyllisyyden tutkimuksissa, tutkimusta ei tarvitse toistaa tässä yhteydessä. On kuitenkin suositeltavaa tallentaa P-sukupolven näytteet tai siemennesteen digitaalinen tallenne mahdollista myöhempää tutkimusta varten.

1.5.5 **Poikaset**

Kukin poikue tutkitaan mahdollisimman pian synnytyksen jälkeen (imetyspäivä 0) ja poikueista määritetään poikasten lukumäärä ja sukupuoli, kuolleena ja elävänä syntyneiden poikasten määrä sekä merkittävien poikkeavuuksien esiintyminen. Poikasista, jotka löydetään kuolleina päivänä 0, on mielellään tutkittava mahdolliset kehityshäiriöt ja kuolinsyy, mikäli mahdollista, ja ruumiit säilötään. Elävät poikaset lasketaan ja punnitaan kukin erikseen synnytyksen yhteydessä (imetyspäivä 0) tai päivänä 1 sekä säännöllisesti punnituspäivinä, esimerkiksi imetyspäivinä 4, 7, 14 ja 21. Emoissa tai poikasissa havaitut ruumiilliset epämuodostumat tai epänormaali käyttäytyminen on merkittävä muistiin.

▼B

Poikasten ruumiillisesta kehityksestä kirjataan lähinnä painonlisäys. Muista fyysisistä muuttujista (esimerkiksi korvien ja silmien avautuminen, hampaiden puhkeaminen, karvankasvu) voidaan saada täydentäviä tietoja, mutta tällaiset tiedot tulee mielellään arvioida sukukypsyystietojen pohjalta (esimerkiksi ikä ja ruumiinpaino emättimen avautuessa tai terskan ja esinahan erotessa) (13). Toiminnalliset tutkimukset (esimerkiksi motoriset toiminnot, aistitoiminnot, refleksien kehitys), jotka liittyvät erityisesti sukukypsyyden saavuttamiseen, suositellaan tehtäväksi F1-sukupolven poikasille ennen vieroitusta ja/tai sen jälkeen, mikäli edellä mainittuja tutkimuksia ei ole tehty erillisten tutkimusten yhteydessä. F1-sukupolven vieroitetuista, paritukseen valituista poikasista tulee määrittää ikä emättimen avautuessa ja esinahan irtautuessa. Peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys on mitattava F1-sukupolven poikasilta syntymän jälkeisenä päivänä 0, mikäli F1-sukupolven sukupuolijakauman muutokset tai sukukypsyyden saavuttamisen ajoitus antavat siihen aihetta.

Toimintoja koskevia havaintoja ei tarvitse tehdä ryhmistä, jotka muutoin osoittavat selviä haittavaikutusten merkkejä (esimerkiksi merkittävä painonnousun väheneminen). Jos toiminnallisia tutkimuksia tehdään, niitä ei tule tehdä paritettaviksi valituille poikasille.

1.5.6 **Ruumiinavaus**

Rakenne-epämuodostumat tai patologiset muutokset tutkitaan makroskooppisesti lopettamisen tai tutkimuksen kuluessa sattuneen kuoleman yhteydessä kaikista poikasia saaneista eläimistä (P ja F1), kaikista poikasista, joissa on näkyviä epämuodostumia tai kliinisiä merkkejä, sekä yhdestä satunnaisesti F1- ja F2-sukupolvesta valitusta poikasesta kummastakin sukupuolesta ja kustakin poikueesta. Erityistä huomiota tulee kiinnittää lisääntymiselimiin. Kuolemaisillaan olevista poikasista, jotka lopetetaan inhimillisellä tavalla, sekä kuolleista poikasista (niiden ruumiin kunnon salliessa) tulee tutkia mahdolliset häiriöt ja/tai kuolinsyy, ja ruumiit tulee säilöä.

Kaikkien ensi kertaa poikineiden naaraiden kohduista tutkitaan implantaatiokohtien olemassaolo ja niiden määrä tavalla, joka ei haittaa histopatologista tutkimusta.

1.5.7 **Elinten paino**

Lopettamisen aikaan P- ja F1-sukupolven vanhemmilta määritetään ruumiinpaino sekä seuraavien elinten paino (parilliset elimet punnitaan erikseen):

— kohtu ja munasarjat,

— kivekset ja lisäkivekset (kokonaispaino ja häntäosan paino),

— eturauhanen,

— rakkularauhaset ja eturauhasen etuosa sekä niiden nesteet ja eturauhanen (yhtenä kokonaisuutena),

— aivot, maksa, munuaiset, perna, aivolisäke, kilpirauhanen ja lisämunuaiset sekä määritetyt kohde-elimet.

F1- ja F2-sukupolvien ruumiinavaukseen valittujen poikasten paino määritetään lopetuksen yhteydessä. Kummastakin sukupuolesta ja kustakin poikueesta satunnaisesti valitulta poikaselta (katso kohta 1.5.6) punnitaan aivot, perna ja kateenkorva.

▼B

Ruumiinavaustulosten ja elinten punnitustulosten arvioinnissa tulee ottaa huomioon muissa toistuvaa annostelua käyttävissä tutkimuksissa tehdyt havainnot, milloin niitä on saatavissa.

1.5.8 **Histopatologinen tutkimus**

1.5.8.1 Poikasia saaneet eläimet

Poikasia saaneilta eläimiltä (P ja F1) irrotetaan seuraavat elimet ja kudokset tai niiden edustavat näytteet. Kudokset tai näytteet käsitellään fiksatiivilla ja säilötään sopivalla tavalla histopatologista tutkimusta varten.

— emätin, kohtu ja kohdunkaula sekä munasarjat (säilötään soveltuvassa fiksatiivissa),

— yksi kives (säilötään Bouinin fiksatiivissa tai vastaavassa), yksi lisäkives, rakkularauhaset, eturauhanen ja sen etuosa,

— etukäteen määritetyt kohde-elimet kaikilta paritukseen valituilta P- ja F1-eläimiltä.

Kaikille paritukseen valituille ylimpiin annosryhmiin ja kontrolliryhmiin kuuluville P- ja F1-sukupolven eläimille tulee tehdä edellä mainittujen elinten ja kudosten täydellinen histopatologinen tutkimus. P-sukupolven eläinten munasarjojen tutkimus ei ole pakollinen. Elimet, joissa todetaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, on tutkittava myös alemmissa ja keskikokoisissa annosryhmissä NOAEL-tason määrityksen helpottamiseksi. Lisäksi on tutkittava histopatologisin menetelmin lisääntymiselimet sellaisilta alempiin ja keskikokoisiin annosryhmiin kuuluvilta eläimiltä, joiden kohdalla epäillään vähentynyttä hedelmällisyyttä, toisin sanoen niiltä, jotka eivät pariutuneet, hedelmöityneet, siittäneet tai synnyttäneet terveitä poikasia, tai niiltä, joiden kiimasykliin tai sperman määrään, liikkuvuuteen tai morfologiaan testiaine vaikutti. Kaikki vakavat vauriot, kuten surkastumat tai kasvaimet on tutkittava.

Kivesten yksityiskohtaisella histopatologisella tutkimuksella (esimerkiksi Bouinin fiksatiivi, parafiinivalu ja 4–5 μm paksut poikittaisleikkeet) tulee määrittää käsittelyn aiheuttamat vaikutukset, kuten rauhaseen jääneet spermatidit, puuttuvat itusolukerrokset tai -tyypit, monitumaiset jättisolut tai spermatogeenisten solujen irtoaminen lumeniin (14). Koskemattomasta lisäkiveksestä tulee tutkia pää-, runko- ja häntäosa pitkittäisleikkeen avulla. Lisäkiveksestä tulee arvioida leukosyytti-infiltraatio, solutyyppien esiintyvyyden muutokset, aberrantit solutyypit sekä siemennesteen fagosytoosi. PAS- ja hematoksyliinivärjäystä voidaan käyttää urosten lisääntymiselinten tutkimukseen.

Imetyksen jälkeisen vaiheen munasarjojen pitäisi sisältää varhaismunarakkuloita ja kasvavia munarakkuloita sekä imetysvaiheen suuria keltarauhasia. Histopatologisessa tutkimuksessa olisi pystyttävä osoittamaan varhaismunarakkuloiden väheneminen kvalitatiivisesti. Varhaismunarakkuloiden kvantitatiivinen arvio tulee tehdä F1-sukupolven naaraille. Eläinten määrän, munasarjaleikkeen valinnan sekä leikkeen näytekoon tulee sopia käytettävään tilastolliseen arviointimenettelyyn. Tutkimuksessa on laskettava varhaismunarakkuloiden määrä, johon voidaan yhdistää pienten kasvavien munarakkuloiden määrä, jotta käsiteltyjä munasarjoja ja kontrolliryhmään kuuluvia munasarjoja voidaan verrata. (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2 Vieroitetut poikaset

Vakavasti epämuodostuneet kudokset ja kohde-elimet kaikilta poikasilta, joilla on ulkoisia epämuodostumia tai kliinisiä merkkejä, sekä yhdeltä sellaiselta F1- ja F2-sukupolvesta satunnaisesti valitulta poikaselta kummastakin sukupuolesta ja kustakin poikueesta, jota ei ole valittu paritukseen, käsitellään fiksatiivilla ja säilötään sopivalla tavalla histopatologista tutkimusta varten. Säilötyille kudoksille tehdään täydellinen histopatologinen määritys, jossa pääpaino on lisääntymiselinten tutkimisessa.

2. MÄÄRITYSTULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tiedot raportoidaan yksilöittäin ja esitetään taulukossa, jossa on eritelty testiryhmittäin ja sukupolvittain eläinten määrä testin alussa, testin aikana kuolleiden tai inhimillisistä syistä lopetettujen eläinten määrä, milloin eläimet ovat kuolleet tai lopetettu, fertiilien eläinten määrä, tiineiden naaraiden määrä, niiden eläinten määrä, joissa myrkyllisyysvaikutuksia on havaittavissa, kuvaus havaituista myrkyllisyysvaikutuksista mukaan lukien myrkytysoireiden alkamisaika, kesto ja vakavuus, millaisia havaintoja vanhemmista ja poikasista on tehty, millaisia histopatologisia muutoksia on havaittu sekä kaikki asiaankuuluvat tiedot poikueesta.

Numeeriset tulokset arvioidaan sopivalla, yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä, joka on valittava tutkimusta suunniteltaessa ja jonka valinta on perusteltava. Annostasovasteiden tilastolliset mallit voivat olla avuksi tietojen analyysissa. Tutkimusselosteessa on oltava analyysimenetelmästä ja käytetystä tietokoneohjelmasta riittävät tiedot, jotta riippumaton arvioija/tilastoasiantuntija voi niiden avulla arvioida ja rekonstruoida analyysin.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI

Kaksi sukupolvea käsittävän lisääntymiskykyyn kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten tutkimuksen löydökset — mukaan lukien ruumiinavauslöydökset ja mikroskooppiset löydökset — on arvioitava havaittujen vaikutusten pohjalta. Arvioinnissa tulee todeta testiaineen annostason ja epämuodostumien tai häiriöiden — mukaan lukien vakavat vauriot, tietyt kohde-elimet, vaikutukset hedelmällisyyteen, kliiniset häiriöt, vaikutukset lisääntymiskykyyn ja poikueen kokoon/-laatuun, ruumiinpainon muutokset, vaikutukset kuolleisuuteen sekä muut myrkyllisyysvaikutukset — esiintyvyyden ja vaikutusten vakavuuden välinen mahdollinen suhde. Testitulosten arvioinnissa on otettava huomioon testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet ja toksikokineettiset tiedot, milloin jälkimmäisiä on saatavissa.

Asianmukaisesti toteutetussa lisääntymiskykyyn kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten tutkimuksessa pitäisi saada tyydyttävä arvio haitattomasta annostasosta sekä tietoa haittavaikutuksista lisääntymiskykyyn, synnytykseen, imetykseen sekä syntymän jälkeiseen kehitykseen mukaan lukien kasvu ja sukupuolinen kehitys.

▼B

2.3 TULOSTEN TULKINTA

Kaksi sukupolvea käsittävä lisääntymiskykyyn kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten tutkimus tuottaa tietoja toistuvan testiainealtistuksen vaikutuksista kaikissa lisääntymiskierron vaiheissa. Erityisesti tutkimus tuottaa tietoja lisääntymisfysiologisista muuttujista sekä poikasten kehityksestä, kasvusta, sukukypsyyden saavuttamisesta ja eloonjäämisestä. Tutkimuksen tulokset on tulkittava yhdessä subkroonisten, prenataalisen kehityksen aikaisten ja toksikokineettisten sekä muiden käytettävissä olevien tutkimustulosten kanssa. Tämän tutkimuksen tulosten pohjalta voidaan arvioida tietyn kemikaalin jatkotutkimustarve. Tulosten ekstrapolointi koskemaan ihmistä on validia rajoitetussa määrin. Tuloksia voidaan parhaiten käyttää haitattoman annostason ja ihmisille sallitun altistuksen määrittämiseen (20) (21) (22) (23).

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1. TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikokemialliset ominaisuudet,

— tunnistetiedot,

— puhtaus.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

Koe-eläinlajit:

— käytetty eläinlaji ja kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— toimittaja, häkit, ravinto, pesäntekoaineet ja niin edelleen,

— kunkin eläimen paino testin alussa.

Testiolosuhteet:

— annostasojen valintaperusteet,

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta/ravintovalmisteesta, testiaineen saavutettu pitoisuus,

— valmisteen stabiilisuus ja tasalaatuisuus,

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen antotavasta,

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk) ja muuntokerroin ravintoon/-juomaveteen sekoitetun testiaineen pitoisuudelle (ppm) tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta.

▼B

Tulokset:

— ravinnonotto sekä nautitun veden määrä, mikäli se on mitattu, ruumiinpainon lisäys nautittua ravintogrammaa kohti sekä saadun testiaineen määrä P- ja F1-eläimillä, lukuun ottamatta sitä aikaa, kun eläimet pidetään yhdessä, ja vähintään imetysajan viimeisen kolmanneksen aikana,

— absorptiotiedot (jos mitattu),

— paritukseen valittujen P- ja F1-eläinten painotiedot,

— poikueiden ja poikasten painotiedot,

— P-eläinten paino lopettamishetkellä sekä elinten absoluuttinen ja suhteellinen paino,

— kliinisten havaintojen laatu, vakavuus ja kesto (riippumatta siitä, korjaantuvatko vauriot myöhemmin),

— kuolinaika testin kuluessa tai elikö koe-eläin lopettamiseen asti,

— myrkkyvastetiedot sukupuolen ja annoksen mukaan sekä parituksen, hedelmällisyyden, tiineyden, syntymän, elinkelpoisuuden ja imetyksen indeksit; selosteessa tulee esittää luvut, joista nämä indeksit on laskettu,

— toksiset tai muut vaikutukset lisääntymisfysiologiaan, poikasiin, syntymänjälkeiseen kasvuun ja niin edelleen,

— ruumiinavauslöydökset,

— yksityiskohtaiset tiedot kaikista histopatologisista löydöksistä,

— P- ja F1 -sukupolvien niiden naaraiden lukumäärä, joilla on normaali kiimasykli, sekä syklin pituus,

— lisäkiveksen hännän siittiöiden kokonaismäärä, progressiivisesti liikkuvien siittiöiden prosenttiosuus, morfologisesti normaalien siittiöiden prosenttiosuus ja poikkeavien siittiöiden prosenttiosuus kunkin tietyn poikkeavuuden mukaan,

— aika pariutumiseen asti, mukaan lukien pariutumista edeltävien päivien määrä,

— tiineyden kesto,

— implantaatioiden ja keltarauhasten määrä sekä poikueiden koko,

— elävänä syntyneiden poikasten määrä ja implantaation jälkeen tapahtuneet abortoitumiset,

— selvästi näkyvistä epämuodostumista kärsivien poikasten lukumäärä; erityisen pienikasvuisten poikasten lukumäärä, jos se on määritetty,

— tiedot poikasten fyysisistä kehitysvaiheista ja muut syntymän jälkeisen kehityksen tiedot; arvioitujen kehitysvaiheiden valinta on perusteltava,

— poikasten ja aikuisten toiminnallisesta havainnoinnista saadut tiedot soveltuvin osin,

— tulosten tilastollinen käsittely tapauksen mukaan.

▼B

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset, mukaan lukien haitattoman altistustason (NOAEL) arvot emojen ja poikasten osalta.

4. **LÄHDELUETTELO**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons. Teoksessa: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (toim.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12: 92–108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 103–107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5: 39–44.

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3): 237–244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6: 267–273

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13: 409–421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5: 449–458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. Teoksessa: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida, s. 319–333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401–415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8: 330–337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6: 491–505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17: 298–303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (toim.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. Teoksessa: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (toim.), Plenum, New York, pp. 421–426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. Teoksessa: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (toim.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5: 379–383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. Teoksessa: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston, and C.A. Kimmel, (toim.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. Teoksessa: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (toim.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. Teoksessa: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (toim.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). Teoksessa: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (toim.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). Teoksessa: Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (toim.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36 **TOKSIKOKINETIIKKA**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 417 (2010). Testikemikaalin toksikokinetiikkaa tarkastelevien tutkimusten tavoitteena on tuottaa tietoa kemikaalin imeytymisestä, jakautumisesta, biotransformaatiosta (esimerkiksi metaboliasta) ja erittymisestä, jotta pitoisuus tai annos voidaan suhteuttaa havaittuun myrkyllisyyteen ja jotta kemikaalin myrkyllisyyden mekanismia opitaan ymmärtämään paremmin. Toksikokinetiikka voi auttaa ymmärtämään toksikologisia tutkimuksia, sillä sen avulla voidaan osoittaa, että koe-eläimet altistuvat testikemikaalille systemaattisesti. Lisäksi sen avulla voidaan määrittää, mitkä ovat kiertäviä osia (alkuperäinen kemikaali / metaboliitit). Näiden tutkimusten perusteella määritetyt toksikokineettiset perusparametrit tuottavat tietoa myös testikemikaalin mahdollisesta kertyvyydestä kudoksiin ja/tai elimiin sekä testikemikaalille altistumisen aiheuttamasta mahdollisesta biotransformaatiosta.

2. Toksikokineettiset tiedot voivat vaikuttaa myös eläinmyrkyllisyystietojen asianmukaisuuden ja oleellisuuden arviointiin, kun tietoja ekstrapoloidaan ihmisiin kohdistuvien vaarojen ja/tai riskien arviointia varten. Lisäksi toksikokineettisistä tutkimuksista voidaan saada hyödyllistä tietoa annostasojen määrittämisestä myrkyllisyystutkimuksia varten (lineaarinen vs. ei-lineaarinen kinetiikka), antoreittiin liittyvistä vaikutuksista, biologisesta hyötyosuudesta sekä tutkimussuunnitelmaan liittyvistä seikoista. Tietyntyyppisiä toksikokineettisiä tietoja voidaan käyttää fysiologiaan perustuvan toksikokineettisen mallin kehittämisessä.

3. Metaboliitteihin liittyville ja toksikokineettisille tiedoille on tärkeitä käyttötarkoituksia: niiden avulla voidaan esimerkiksi ennustaa mahdollisia myrkyllisyyksiä ja vaikutustapoja sekä niiden suhdetta annostasoon ja altistumisreittiin. Metaboliatiedoista voidaan lisäksi saada hyödyllistä tietoa, jota voidaan käyttää arvioitaessa testikemikaalin eksogeenisesti tuottamille metaboliiteille altistumisen toksikologista merkitystä.

4. Asianmukaisten toksikokineettisten tietojen avulla voidaan vahvistaa kvantitatiivisten rakenne-aktiivisuussuhteiden sekä interpolointiin tai ryhmittelyyn perustuvien toimintatapojen hyväksyttävyyttä ja sovellettavuutta kemikaalien turvallisuuden arvioinnissa. Kinetiikkatietoja voidaan käyttää myös muiden tutkimusten toksikologisen merkityksen arvioinnissa (esimerkiksi *in vivo / in vitro*).

5. Tätä testimenetelmää voidaan soveltaa, kun testikemikaalia annetaan suun kautta, ellei muuta antoreittiä ole mainittu (katso etenkin 74–78 kohta).

ALUSTAVAT HUOMIOT

6. Eri luokkiin kuuluvien kemikaalien (esimerkiksi torjunta-aineet, biosidit, teollisuuskemikaalit) toksikokinetiikkaan liittyvien tutkittavien ominaisuuksien ja parametrien mittauksen osalta sääntelyjärjestelmissä on erilaisia vaatimuksia ja tarpeita. Toisin kuin useimmissa testimenetelmissä, tässä testimenetelmässä kuvataan toksikokineettistä testausta, johon sisältyy monia mittauksia ja tutkittavia ominaisuuksia. Tulevaisuudessa saatetaan kehittää lukuisia uusia testimenetelmiä ja/tai ohjeasiakirjoja, joissa kutakin tutkittavaa ominaisuutta kuvataan erikseen ja tarkemmin. Tämän testimenetelmän osalta se, mitä testejä tai arviointeja tehdään, määräytyy kunkin sääntelyjärjestelmän vaatimusten ja/tai tarpeiden mukaisesti.

▼M4

7. Kun testikemikaalia arvioidaan sääntelytarkoituksia varten, sen toksikokineettisen käyttäytymisen määrittämiseksi voidaan joutua tekemään useita tutkimuksia. Tiettyjen sääntelytarpeiden tai tilanteiden mukaan kaikki mahdolliset tutkimukset eivät kuitenkaan ole välttämättä tarpeen testikemikaalin arvioinnissa. Toksikokineettisten tutkimusten suunnittelussa tarvitaan siis joustavuutta, kun otetaan huomioon tutkittavan testikemikaalin ominaisuudet. Joissakin tapauksissa on selvitettävä vain tietyt kysymykset testikemikaaliin liittyviä vaaroja ja riskejä koskevien huolenaiheiden hälventämiseksi. Joissakin tilanteissa toksikokineettisiä tietoja voidaan kerätä muissa tutkimuksissa tehtävän arvioinnin yhteydessä. Toisissa tilanteissa ylimääräiset ja/tai kattavammat toksikokineettiset tutkimukset voivat olla tarpeen sen mukaan, mitkä ovat sääntelytarpeet ja/tai herääkö testikemikaalin arvioinnin aikana uusia kysymyksiä.

8. Testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista ja sen oleellisista metaboliiteista ja niiden analogeista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista tutkimuksen laadun parantamiseksi ja eläinten käytön minimoimiseksi. Tähän voi sisältyä muiden oleellisten testimenetelmien avulla saatuja tietoja (*in vivo* -tutkimukset, *in vitro* -tutkimukset ja/tai *in silico* -arvioinnit). Seuraavista tiedoista voi olla hyötyä tutkimuksen suunnittelussa ja tulosten tulkinnassa: kemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kuten oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin (ilmaistuna log P_{OW} -arvona), pKa, vesiliukoisuus, höyrynpaine ja molekyylipaino. Ne voidaan määrittää asianmukaisin menetelmin, jotka on kuvattu kulloisissakin testimenetelmissä.

RAJOITUKSET

9. Tätä testimenetelmää ei ole tarkoitettu käytettäväksi erityisolosuhteissa, kuten tiineiden tai imettävien eläinten ja niiden jälkeläisten yhteydessä tai arvioitaessa elintarvikkeita tuottavissa altistuneissa eläimissä olevia mahdollisia jäämiä. Testimenetelmän B.36 mukaisen tutkimuksen tuottamista tiedoista voidaan kuitenkin saada taustatietoa, joka ohjaa nimenomaan näihin seikkoihin liittyvien tutkimusten suunnittelua. Tätä testimenetelmää ei ole tarkoitettu nanomateriaalien testaamiseen. OECD:n testiohjeiden sovellettavuutta nanomateriaaleihin koskevasta alustavasta arvioinnista laadittu raportti viittaa siihen, että testiohje nro 417 (joka vastaa tätä testimenetelmää B.36) ei välttämättä sovellu nanomateriaaleihin (1).

MÄÄRITELMÄT

10. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä.

ELÄINTEN HYVINVOINTIA KOSKEVAT HUOMAUTUKSET

11. Ohjeita eläinten humaanista käsittelystä on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 19 (2). OECD:n ohjeasiakirjaan GD 19 on suositeltavaa tutustua kaikkien tässä testimenetelmässä kuvattujen *in vitro*- ja *in vivo* -tutkimusten yhteydessä.

MENETELMIEN KUVAUS

Esitutkimukset

12. Esitutkimusten käyttö on erittäin suositeltavaa, kun valitaan toksikokineettisten tutkimusten kokeellisia parametreja (kuten metabolia, massatase, analyysimenetelmät, annoksen määritys, uloshengitysilman CO_2-pitoisuus jne.). Kemikaalia ei välttämättä tarvitse leimata radioaktiivisesti luonnehdittaessa joitakin näistä parametreista.

▼M4

Eläinten valinta

Laji

13. Toksikokinetiikan testauksessa käytettävän eläinlajin (ja kannan) on oltava mieluiten sama kuin muissa kyseisen testikemikaalin yhteydessä toteutetuissa toksikologisissa tutkimuksissa. Yleensä on käytettävä rottaa, koska sitä on käytetty laajalti toksikologisissa tutkimuksissa. Toisten tai ylimääräisten lajien käyttö voi olla perusteltua, jos kriittisistä toksikologisista tutkimuksista on saatu näyttöä merkittävästä myrkyllisyydestä näissä lajeissa tai jos niihin liittyvä myrkyllisyys/toksikokinetiikka osoittautuu olevan ihmisen kannalta merkityksellisempää. Eläinlajin ja kannan valinta on perusteltava.

14. Ellei muuta ole mainittu, tässä testimenetelmässä testilajilla tarkoitetaan rottaa. Tiettyjä menetelmän näkökohtia voi olla tarpeen muokata, jos käytetään muita testilajeja.

Ikä ja kanta

15. Tutkimuksessa tulee käyttää nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä (ikä annostelun aikana yleensä 6–12 viikkoa) (katso myös 13 ja 14 kohta). Jos tutkimuksessa käytetään muita kuin nuoria täysikasvuisia eläimiä, se on perusteltava. Kaikkien eläinten on oltava samanikäisiä tutkimuksen alussa. Yksittäisten eläinten paino saa vaihdella enintään ± 20 prosenttia testiryhmän keskipainosta. Käytettävän kannan on oltava mieluiten sama kuin se, jota on käytetty testikemikaalia koskevan toksikologisen tietokannan laatimisessa.

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

16. Jokaista testattavaa annosta kohti on käytettävä vähintään neljää eläintä, joiden sukupuoli on sama. Käytettävien eläinten sukupuolen valinta on perusteltava. Kummankin sukupuolen (neljän uroksen ja neljän naaraan) käyttöä on harkittava, jos on näyttöä siitä, että myrkyllisyydessä on huomattavia sukupuoleen liittyviä eroja.

Koe-eläintilat ja ruokinta

17. Yleensä eläimet on pidettävä häkeissä yksittäin testijakson ajan. Ryhmähäkeissä pitäminen voi olla perusteltua tietyissä olosuhteissa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C) ja suhteellisen ilmankosteuden 30–70 prosenttia. Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Testikemikaali

18. Tutkimuksen kaikissa massataseen ja metaboliittien määrityksissä on käytettävä ^{14}C-leimattua radioaktiivista testikemikaalia. Jos voidaan osoittaa, että

— massatase ja metaboliitit voidaan määrittää asianmukaisesti käyttämällä muuta kuin radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia

— ei-radioaktiivisen testikemikaalin kanssa käytetyn menetelmän analyyttinen tarkkuus ja herkkyys on sama tai parempi kuin se, joka olisi voitu saada radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia käyttäen

▼M4

radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia ei tarvitse käyttää. Myös muita radioaktiivisia ja vakaita isotooppeja voidaan käyttää varsinkin, jos kyseinen osa aiheuttaa testikemikaalin myrkyllisyyden tai on osa sitä. Jos mahdollista, radioleima on sijoitettava metabolisesti vakaan molekyylin (joka ei ole vaihdettavissa, ei poistu metabolisesti CO_2:na eikä tule osaksi organismin hiilipoolia eli biomassaa) ydinosaan. Molekyyli voi olla tarpeen leimata useista paikoista tai tietyiltä alueilta, jotta testikemikaalin metabolista kulkeutumista voidaan seurata.

19. Radioaktiivisesti leimatut ja leimaamattomat testikemikaalit on analysoitava asianmukaisilla menetelmillä puhtauden ja identiteetin määrittämiseksi. Radioaktiivisen testikemikaalin on oltava radioaktiivisesti niin puhdas kuin tietylle testikemikaalille on mahdollista (puhtausasteen on oltava mieluiten yli 95 prosenttia). Epäpuhtaudet, joiden pitoisuus on vähintään kaksi prosenttia, on pyrittävä tunnistamaan. Puhtaus sekä määritettyjen epäpuhtauksien identiteetti ja pitoisuus on ilmoitettava. Yksittäisissä sääntelyohjelmissa voidaan antaa lisäohjeita seoksista koostuvien testikemikaalien määrittämistä ja spesifikaatioita sekä puhtauden määrittämiseen tarkoitettujen menetelmien valintaa varten.

Annoksen valinta

Esitutkimus

20. Tavallisesti esitutkimukseen riittää kerta-annos suun kautta. Annoksen on oltava myrkytön mutta riittävän suuri, jotta eritteistä (ja tarvittaessa plasmasta) voidaan määrittää metaboliitit ja jotta voidaan täyttää esitutkimuksen ilmoitettu tarkoitus tämän testimenetelmän 12 kohdassa todetun mukaisesti.

Päätutkimukset

21. Päätutkimuksissa on suotavaa käyttää vähintään kahta annosta, sillä vähintään kahdesta annosryhmästä saatavista tiedoista voi olla apua määritettäessä annoksia muihin myrkyllisyystutkimuksiin ja arvioitaessa jo saatavilla olevien myrkyllisyystestien annosvastetta.

22. Kahta annosta käytettäessä molempien on oltava riittävän suuria, jotta eritteistä (ja tarvittaessa plasmasta) voidaan määrittää metaboliitit. Myrkyllisyystiedot on otettava huomioon annoksen valinnassa. Jos tietoja ei ole saatavilla (esimerkiksi akuuteista suun kautta aiheutuvaa myrkyllisyyttä käsittelevistä tutkimuksista, joihin on kirjattu myrkyllisyyden kliiniset merkit, tai toistuvan annoksen myrkyllisyyttä käsittelevistä tutkimuksista), suuremmaksi annokseksi voidaan harkita arvoa, joka on pienempi kuin LD_{50}-estimaatti (suun ja ihon kautta) tai LC_{50}-estimaatti (hengitysteiden kautta) tai akuutin myrkyllisyystason estimaatin pienempi arvo. Pienemmän annoksen tulee olla jokin osuus suuremmasta annoksesta.

23. Jos tutkitaan vain yhtä annostasoa, annoksen on oltava riittävän suuri, jotta eritteistä (ja tarvittaessa plasmasta) voidaan määrittää metaboliitit, mutta annoksen ei tule aiheuttaa ilmeistä myrkyllisyyttä. Lisäksi on perusteltava, miksi tutkimukseen ei sisällytetty toista annostasoa.

24. Jos on määritettävä annoksen vaikutus kineettisiin prosesseihin, kaksi annosta ei välttämättä riitä, ja vähintään yhden annoksen on oltava riittävän suuri näiden prosessien saturoimiseksi. Jos plasman pitoisuus-aikakäyrän alle jäävä pinta-ala (AUC-arvo) ei ole lineaarinen kahden päätutkimuksessa käytetyn annostason välillä, se on vahva osoitus siitä, että yksi tai useampi kineettinen prosessi saturoituu jossain kohdassa kahden annostason välillä.

▼M4

25. Sellaisten testikemikaalien yhteydessä, joiden myrkyllisyys on vähäistä, on käytettävä enimmäisannosta 1 000 mg painokiloa kohti (suun ja ihon kautta -antoreitit) (jos annostelu tapahtuu hengitysteiden kautta, katso ohjeet tämän liitteen luvusta B.2; yleensä tämä annos on enintään 2 mg/l). Kemikaalikohtaisten pohdintojen perusteella suurempi annos voi olla tarpeen sen mukaan, mitkä ovat sääntelytarpeet. Annoksen valinta on aina perusteltava.

26. Tiedot kerta-annoksen toksikokinetiikasta ja kudoksiin jakaantumisesta saattavat riittää mahdollisen kertyvyyden ja/tai pysyvyyden määrittämiseksi. Tietyissä olosuhteissa saatetaan kuitenkin tarvita toistuvan annoksen annostelu, jotta i) mahdollista kertyvyyttä ja/tai pysyvyyttä tai toksikokineettisiä muutoksia (esimerkiksi entsyymi-induktiota ja -estoa) voidaan käsitellä tarkemmin, tai ii) jos sovellettava sääntelyjärjestelmä edellyttää sitä. Vaikka tutkimuksissa, joissa käytetään toistuvaa annostelua, pienen annoksen toistuva annostelu yleensä riittää, suuren annoksen toistuva annostelu voi kuitenkin olla tarpeen tietyissä olosuhteissa (katso myös 57 kohta).

Testikemikaalin annostelu

27. Testikemikaali on liuotettava tai suspendoitava tasaisesti samaan kantaja-aineeseen, jota on käytetty muissa testikemikaalilla tehdyissä tutkimuksissa, joissa tarkasteltiin suun kautta aiheutuvaa myrkyllisyyttä ja joissa käytettiin ruokintaletkua, mikäli kantaja-aineesta on saatavilla tällaisia tietoja. Kantaja-aineen valinta on perusteltava. Kantaja-aineen valinta ja annostelutilavuus on otettava huomioon tutkimuksen suunnittelussa. Tavanomainen antotapa on ruokintaletkun kautta, mutta tietyissä tilanteissa kemikaali voi olla parempi antaa gelatiinikapselissa tai ravinnon seassa (kummassakin tapauksessa on esitettävä perustelut). Jokaiselle eläimelle annettu todellinen annos on vahvistettava.

28. Ruokintaletkun kautta kerrallaan annosteltavan nesteen enimmäistilavuus määräytyy koe-eläinten koon, annoksen kantaja-aineen tyypin ja sen mukaan, onko eläin pidetty ravinnotta ennen testikemikaalin antamista. Ravinnon antaminen tai ravinnotta pitäminen ennen annostelua on perusteltava. Yleensä tilavuus on pidettävä niin pienenä kuin vesipitoisten tai muiden kuin vesipitoisten kantaja-aineiden osalta on käytännöllistä. Jyrsijöillä annoksen tilavuus saa yleensä olla enintään 10 ml painokiloa kohti. Lipofiilisempien testikemikaalien kanssa käytettävien kantaja-aineiden aloitustilavuus voi olla 4 ml painokiloa kohti. Toistuvassa annostelussa on harkittava pienempiä annostilavuuksia (esimerkiksi 2–4 ml painokiloa kohti), kun eläinten pitäminen ravinnotta päivittäin on vasta-aiheista. Mikäli mahdollista, on harkittava sen annostilavuuden käyttämistä, joka annettiin suun kautta ruokintaletkulla muissa testikemikaalin tutkimuksissa.

29. Testikemikaali voidaan annostella suonensisäisesti, ja testikemikaalin pitoisuus veressä ja/tai eritteissä voidaan mitata biologisen hyötyosuuden tai suhteellisen oraalisen absorption määrittämiseksi. Suonensisäistä annostelua koskevassa tutkimuksessa testikemikaalia annetaan kerta-annos (joka on yleensä enintään pienemmän suun kautta annettavan annoksen suuruinen, katso annoksen valinta -kohta) käyttäen asianmukaista kantaja-ainetta. Tätä ainetta on annettava sopiva tilavuus (esimerkiksi 1 ml painokiloa kohti) valittuun antopaikkaan vähintään neljälle sopivaa sukupuolta edustavalle eläimelle (molempia sukupuolia voidaan käyttää, mikäli tarpeen, katso 16 kohta). Kun testikemikaalia annetaan suonensisäisesti, annos on valmisteltava siten, että kemikaali on täysin liuennut tai suspendoitunut.

▼M4

Suonensisäisessä annostelussa käytettävä kantaja-aine ei saa rikkoa verisuonia tai häiritä verenvirtausta. Jos testikemikaali annetaan infuusiona, infuusionopeus on ilmoitettava ja se on pidettävä vakiona eläinten välillä, jos käytetään infuusiopumppua. Jos eläimelle asetetaan kanyyli kaulalaskimoon (testikemikaalin antamista ja/tai verinäytteiden ottamista varten) tai jos annosteluun käytetään reisilaskimoa, on käytettävä anestesiaa. Anestesian tyyppi on valittava huolellisen harkinnan perustella, sillä se voi vaikuttaa toksikokinetiikkaan. Eläinten on annettava toipua riittävästi ennen testikemikaalin ja kantaja-aineen annostelua.

30. Muita antoreittejä, kuten suun ja hengitysteiden kautta, (katso 74–78 kohta), voidaan käyttää tiettyjen testikemikaalien yhteydessä, kun otetaan huomioon niiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ja ihmisten odotuksenmukainen käyttö tai altistuminen.

Mittaukset

Massatase

31. Massatase määritetään laskemalla yhteen annetun (radioaktiivisen) annoksen prosenttiosuus, joka on erittynyt virtsaan, ulosteeseen ja uloshengitysilmaan, sekä prosenttiosuus, joka on kudoksissa, eläimen ruumiin jäännöksissä ja koe-eläinhäkin pesuvedessä (katso 46 kohta). Yleensä annostellun (radioaktiivisesti leimatun) testikemikaalin kokonaissaantoja pidetään riittävinä, kun ne ovat vähintään 90 prosenttia.

Imeytyminen

32. Alustava arvio imeytymisestä saadaan vähentämällä maha-suolikanavassa ja/tai ulosteessa olevan annoksen prosenttiosuus määritetystä massataseesta. Katso lisätietoja imeytymisen prosenttiosuuden laskemisesta 33 kohdasta. Lisätietoja eritteiden tutkimisesta on 44–49 kohdassa. Jos suun kautta annostelun jälkeisen imeytymisen määrää ei voida määrittää tarkasti massatasetutkimusten perusteella (esimerkiksi kun ulosteessa on yli 20 prosenttia annetusta annoksesta), lisätutkimukset voivat olla tarpeen. Nämä tutkimukset voivat koostua joko 1) testikemikaalin annostelusta suun kautta ja testikemikaalipitoisuuden mittaamisesta sapessa tai 2) testikemikaalin annostelusta suun kautta ja suonensisäisesti sekä testikemikaalin nettopitoisuuden mittaamisesta virtsassa, uloshengitysilmassa ja eläimen ruumiissa kummankin antoreitin osalta. Kummassakin tutkimusmenetelmässä radioaktiivisuuden mittaus toteutetaan testikemikaalin ja metaboliittien kemikaalikohtaisen analyysin korvaavana menetelmänä.

33. Jos tehdään sappeen erittymistä koskeva tutkimus, käytetään yleensä suun kautta -antoreittiä. Tässä tutkimuksessa kanyloidaan vähintään neljän sopivaa sukupuolta edustavan eläimen (tai tarvittaessa kumpaakin sukupuolta edustavien eläinten) sappitiehyet, ja eläimille annetaan kerta-annos testikemikaalia. Testikemikaalin annostelun jälkeen radioaktiivisuuden/testikemikaalin erittymistä sappeen on seurattava niin pitkään kuin on tarpeen, jotta annetusta annoksesta voidaan arvioida se prosenttiosuus, joka erittyy tätä reittiä. Sen avulla voidaan laskea suoraan suun kautta tapahtuvan imeytymisen määrä seuraavasti:

$$\text{Imeytymisen prosenttiosuus} = \begin{array}{l}(\text{määrä sapessa} + \text{virtsassa} + \text{uloshengitysilmassa} \\ + \text{ruumiissa ilman maha} - \text{suolikanavan sisältöä}) \\ /\text{annettu annos} \times 100\end{array}$$

34. Tiettyihin luokkiin kuuluvien testikemikaalien osalta imeytynyt annos voi erittyä suolen limakalvojen kautta. Näissä tapauksissa katsotaan, että ulosteessa olevan annoksen prosenttiosuuden mittaus rotilta, joiden sappitiehyt on kanyloitu ja joille annos on annettu suun kautta, ei edusta imeytymätöntä annosta. Kun suoleen erittymistä oletetaan tapahtuvan, on suositeltavaa, että imeytyneen annoksen prosenttiosuus perustuu imeytymiseen, joka lasketaan vertaamalla suun kautta -reitin ja suonensisäisen reitin erittymistä (kanyloimaton tai sappitiehyeen kanyloitu rotta) (katso 35 kohta). Lisäksi suositellaan, että jos suoleen erittymisen kvantifiointia pidetään tarpeellisena, erittyminen mitataan myös rotalta, jonka sappitiehyt on kanyloitu, annoksen suonensisäisen annostelun jälkeen.

▼M4

Biologinen hyötyosuus

35. Biologinen hyötyosuus voidaan määrittää suun kautta ja suonensisäisen annostelun ryhmien plasman/veren kinetiikasta 50–52 kohdassa kuvatun mukaisesti testikemikaalin ja/tai tärkeimpien metaboliittien spesifisellä kemiallisella analyysilla, jolloin radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia ei tarvita. Testikemikaalin tai tärkeimmän metaboliitin (tärkeimpien metaboliittien) biologinen hyötyosuus (F) voidaan laskea seuraavasti:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dose_{IV}/Dose_{exp})$$

Tässä yhtälössä AUC on plasman pitoisuus-aikakäyrän alle jäävä pinta-ala ja exp tarkoittaa testattua antoreittiä (suun, ihon tai hengitysteiden kautta).

36. Systeemisten vaikutusten riskinarvioinnissa myrkyllisen komponentin biologista hyötyosuutta pidetään yleensä ensisijaisena imeytymisen prosenttiosuuteen nähden, kun eläinkokeiden systeemisiä pitoisuuksia verrataan vastaaviin biomonitorointitietoihin, jotka on saatu työntekijöiden altistumistutkimuksista. Tilanne voi muuttua monimutkaisemmaksi, jos annokset ovat ei-lineaarisella alueella, joten on tärkeää, että toksikokineettisessä seulonnassa määritetään lineaarisen alueen annokset.

Kudoksiin jakautuminen

37. Tieto testikemikaalin ja/tai sen metaboliittien jakautumisesta kudoksiin on tärkeää kohdekudosten tunnistamiseksi, myrkyllisyyden taustalla olevien mekanismien ymmärtämiseksi sekä tiedon saamiseksi testikemikaalin ja sen metaboliittien mahdollisesta kertyvyydestä ja pysyvyydestä. Kudoksissa ja eläimen ruumiissa olevan (radioaktiivisen) kokonaisannoksen prosenttiosuus on mitattava vähintään erityskokeen päättyessä (yleensä viimeistään seitsemän päivän kuluttua annoksen antamisesta tai aikaisemmin testikemikaalille tyypillisen käyttäytymisen mukaan). Jos kudoksissa ei havaita testikemikaalia tutkimuksen päättyessä (esimerkiksi sen takia, että testikemikaali on voinut eliminoitua ennen tutkimuksen päättymistä lyhyen puoliintumisajan vuoksi), tulosten tulkinnassa on oltava huolellinen virhetulkintojen välttämiseksi. Tällaisissa tilanteissa kudoksiin jakautumista on tutkittava samalla kun tutkitaan testikemikaalin (ja/tai metaboliitin) huippupitoisuutta plasmassa/veressä (T_{max}) tai virtsaan erittymisen huippunopeutta, mikäli tarpeen (katso 38 kohta). Lisäksi tietyissä aikapisteissä on mahdollisesti otettava kudosnäytteitä, jotta voidaan arvioida testikemikaalin ja/tai sen metaboliittien jakautumista kudoksiin sekä aikariippuvuutta (mikäli tarpeen). Siitä on apua myös massataseen määrittämisessä ja/tai muissa seikoissa sen mukaan, mitä toimivaltainen viranomainen edellyttää. Kudosnäytteet on otettava seuraavista kudoksista: maksa, rasva, maha-suolikanava, munuaiset, perna, kokoveri, eläimen ruumis, kohde-elimen kudokset ja muut sellaiset kudokset, joilla voi olla merkitystä testikemikaalin toksikologisessa arvioinnissa (esimerkiksi kilpirauhanen, punasolut, lisääntymiselimet, iho, silmät (etenkin värillisillä eläimillä)). Ylimääräisten kudosten analyysia samoissa aikapisteissä on harkittava, jotta eläimiä voidaan käyttää mahdollisimman tehokkaasti, ja erityisesti silloin, kun kohde-elimeen kohdistuvaa myrkyllisyyttä havaitaan subkroonisissa tai kroonisissa myrkyllisyystutkimuksissa. (Radioaktiivinen) jäämäpitoisuus ja kudos/plasma-pitoisuussuhde on myös ilmoitettava.

38. Lisäksi kudokseen jakautumisen arviointia voidaan tarvita muissa aikapisteissä, kuten plasman/veren huippupitoisuuden (esimerkiksi T_{max}) tai virtsaan erittymisen huippunopeuden aikana (ne on selvitetty plasman/veren kinetiikkaa tai erittymistä käsittelevissä kokeissa). Myös toimivaltainen viranomainen voi edellyttää näitä arviointeja. Nämä tiedot voivat olla hyödyllisiä, kun pyritään ymmärtämään myrkyllisyyttä sekä testikemikaalin ja metaboliittien kertyvyyttä ja pysyvyyttä. Näytteiden valinta on perusteltava; yleensä analysoitavien näytteiden on oltava samoja kuin edellä mainitut (katso 37 kohta).

▼M4

39. Radioaktiivisuuden kvantifiointi kudoksiin jakautumista käsittelevissä tutkimuksissa voidaan toteuttaa seuraavilla menetelmillä: elinten dissekointi, homogenisointi, polttaminen ja/tai liuottaminen sekä talteen otettujen jäämien nestetuikelaskenta (LSC). Tietyt tekniikat, esimerkiksi määrällinen koko kehon autoradiografia ja reseptoreiden mikroskooppinen autoradiografia, voivat osoittautua hyödyllisiksi, kun määritetään testikemikaalin jakautumista elimiin ja/tai kudoksiin (3) (4), vaikka näiden tekniikoiden kehitys on eri vaiheessa.

40. Muiden altistumisreittien kuin suun kautta -reitin osalta näytteet on kerättävä ja analysoitava tietyistä kudoksista, esimerkiksi inhalaatiotutkimuksissa keuhkoista ja ihotutkimuksissa ihosta. Katso 74–78 kohta.

Metabolia

41. Eritteistä (ja plasmasta, jos tarpeen) on otettava näytteet, jotta muuttumaton testikemikaali ja metaboliitit voidaan määrittää ja kvantifioida 44–49 kohdassa kuvatun mukaisesti. Näytteiden yhdistäminen metaboliittien määrittämiseksi tietyssä annosryhmässä on hyväksyttävää. Metaboliittien profilointi kultakin ajanjaksolta on suositeltavaa. Jos tämä ei ole mahdollista näytteiden puuttumisen ja/tai radioaktiivisuuden vuoksi, virtsa- ja ulostenäytteiden yhdistäminen eri aikapisteistä on hyväksyttävää. Sen sijaan eri sukupuolilta peräisin olevien tai eri annoksiin liittyvien näytteiden yhdistäminen ei ole hyväksyttävää. Käsiteltyjen eläinten virtsan, ulosteen ja uloshengitysilman (ja tarvittaessa sapen) radioaktiivisuus on arvioitava käyttäen asianmukaisia laadullisia ja määrällisiä menetelmiä.

42. Kaikki metaboliitit, joiden määrä on vähintään viisi prosenttia annetusta annoksesta, on pyrittävä määrittämään, jotta testikemikaalista voidaan laatia metaboliamalli. Testikemikaalit, joiden määrän eritteissä on havaittu olevan vähintään viisi prosenttia annetusta annoksesta, on määritettävä. Määrittäminen tarkoittaa komponenttien tarkkaa rakenteellista määrittelemistä. Tavallisesti määritys tehdään joko metaboliitin rinnakkaiskromatografialla tunnettujen standardien mukaisesti käyttäen kahta erilaista järjestelmää tai tekniikoita, joilla positiivinen rakennemääritys on mahdollista. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi massaspektrometria, ydinmagneettiresonanssispektroskopia (NMR) jne. Rinnakkaiskromatografian osalta kromatografiatekniikoita, joissa hyödynnetään samaa paikallaan pysyvää faasia kahden erilaisen liuotinjärjestelmän kanssa, ei pidetä riittävänä kahden menetelmän varmistuksena metaboliitin identiteetille, koska menetelmät eivät ole toisistaan riippumattomia. Rinnakkaiskromatografialla määrittäminen on tehtävä käyttämällä kahta erilaista, analyyttisesti riippumatonta järjestelmää, kuten ohutlevykromatografiaa (käänteisfaasi- ja suorafaasi-TLC:tä) ja korkean suorituskyvyn nestekromatografiaa (HPLC:tä). Jos kromatografinen erottelu on laadultaan hyväksyttävä, spektroskopian keinoin tehtävä lisävahvistus ei ole tarpeen. Selvä määritys voidaan tuottaa vaihtoehtoisesti menetelmillä, joista saadaan rakenteellista tietoa. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi nestekromatografia/massaspektrometria (LC-MS) tai nestekromatografia / kaksivaiheinen massaspektrometria (LC-MS/MS), kaasukromatografia/massaspektrometria (GC-MS) ja NMR-spektrometria.

43. Jos ei ole mahdollista määrittää metaboliitteja, joiden pitoisuus on vähintään viisi prosenttia annetusta annoksesta, loppuraportissa on esitettävä sille perustelut tai selitys. Voi olla tarkoituksenmukaista määrittää myös metaboliitteja, joiden pitoisuus on alle viisi prosenttia annetusta annoksesta. Tämä auttaa ymmärtämään metaboliareittiä testikemikaaliin liittyvien vaarojen ja/tai riskin arvioimisen kannalta paremmin. Rakenne on vahvistettava aina kun mahdollista. Tähän voi sisältyä myös profilointi plasmassa tai veressä tai muissa kudoksissa.

▼M4

Erittyminen

44. Annetun annoksen erittymisnopeus ja -määrä on määritettävä mittaamalla virtsasta, ulosteesta ja uloshengitysilmasta talteen otetun (radioaktiivisen) annoksen prosenttiosuus. Näistä tiedoista on apua myös massataseen määrittämisessä. Virtsan, ulosteen ja uloshengitysilman kautta erittyneen testikemikaalin määrät on määritettävä sopivin väliajoin (katso 47–49 kohta). Toistuvan annoksen kokeet on suunniteltava asianmukaisesti siten, että erittymistietojen kerääminen on mahdollista 26 kohdassa kuvattujen tavoitteiden saavuttamiseksi. Tämän avulla vertailu kerta-annoskokeisiin on mahdollista.

45. Jos esitutkimus on osoittanut, ettei testikemikaalia (radioaktiivisuutta) erity uloshengitysilmaan suuria määriä (49 kohdan mukaisesti), varsinaisessa tutkimuksessa ei tarvitse kerätä uloshengitysilmaa.

46. Jokainen eläin on sijoitettava erilliseen metaboliahäkkiin eritteiden (virtsan, ulosteen ja uloshengitysilman) keräämistä varten. Kunkin keräysvaiheen lopuksi (katso 47–49 kohta) metaboliahäkit on huuhdeltava sopivalla liuottimella (tätä kutsutaan ”häkin pesuvedeksi”), jotta varmistetaan, että testikemikaalia saadaan talteen mahdollisimman paljon (radioaktiivisuus). Eritteiden kerääminen on lopetettava seitsemäntenä päivänä tai sen jälkeen, kun vähintään 90 prosenttia annetusta annoksesta on saatu talteen sen mukaan, kumpi vaatimus täyttyy ensin.

47. Testikemikaalin (radioaktiivisuuden) kokonaismäärät virtsassa on määritettävä vähintään kahdessa aikapisteessä ensimmäisenä keruupäivänä. Toisen niistä on oltava 24 tuntia annostelun jälkeen. Sen jälkeen tämä on tehtävä päivittäin tutkimuksen päättymiseen saakka. Useamman kuin kahden näytteenottoajankohdan käyttäminen ensimmäisenä päivänä (esimerkiksi 6, 12 ja 24 tunnin kuluttua) on suositeltavaa. Esitutkimusten tulokset tulee analysoida tietojen saamiseksi vaihtoehtoisista tai ylimääräisistä näytteidenkeruun aikapisteistä. Näytteidenkeruuaikataulut on perusteltava.

48. Testikemikaalin (radioaktiivisuuden) kokonaismäärät ulosteessa on määritettävä päivittäin tutkimuksen päättymiseen saakka siten, että ensimmäinen määritys tehdään 24 tunnin kuluttua annoksen antamisesta, elleivät vaihtoehtoiset tai ylimääräiset aikapisteet ole esitutkimusten mukaan tarkoituksenmukaisempia. Vaihtoehtoiset näytteidenkeruuaikataulut on perusteltava.

49. Uloshengitysilman CO_2:n ja muiden haihtuvien aineiden kerääminen voidaan lopettaa tietyssä kokeessa, jos uloshengitysilmassa havaitaan alle yksi prosentti annetusta annoksesta 24 tunnin pituisen keräysjakson aikana.

Aikaan perustuvat tutkimukset

Plasman/veren kinetiikka

50. Näiden tutkimusten tarkoituksena on tuottaa estimaatit testikemikaalin toksikokineettisistä perusparametreista [esimerkiksi C_{max}, T_{max}-puoliintumisaika ($t_{1/2}$), AUC]. Nämä tutkimukset voidaan tehdä yhdellä annoksella, mieluummin kuitenkin kahdella tai useammalla annoksella. Annos on määritettävä kokeen luonteen ja/tai käsiteltävän ongelman mukaan. Kinetiikkatietoja voidaan tarvita tiettyjen ongelmien, kuten testikemikaalin biologisen hyötyosuuden, ratkaisemiseksi tai sen selvittämiseksi, miten annos vaikuttaa puhdistumaan (ts. saturoituuko puhdistuma annoksesta riippuvalla tavalla).

51. Näissä tutkimuksissa tulee käyttää vähintään neljää eläintä sukupuolta ja annosryhmää kohti. Käytettävien eläinten sukupuolen valinta on perusteltava. Kummankin sukupuolen (neljän uroksen ja neljän naaraan) käyttöä on harkittava, jos on näyttöä siitä, että myrkyllisyydessä on huomattavia sukupuoleen liittyviä eroja.

▼M4

52. (Radioaktiivisesti leimatun) testikemikaalin antamisen jälkeen jokaiselta eläimeltä on otettava verinäyte sopivissa aikapisteissä käyttäen asianmukaista näytteenottomenetelmää. Eläintä kohti otettavien verinäytteiden tilavuutta ja lukumäärää voidaan joutua rajoittamaan siksi, että toistuva näytteenotto saattaa vaikuttaa eläimen terveyteen/fysiologiaan ja/tai analyysimenetelmän herkkyyteen. Jokaisen eläimen näytteet on analysoitava erikseen. Tietyissä olosuhteissa (esimerkiksi metaboliittien luonnehdinta) voi olla tarpeen yhdistää useamman kuin yhden eläimen näytteitä. Yhdistetyt näytteet on merkittävä selvästi, ja yhdistämiselle on esitettävä perustelut. Jos käytetään radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia, kokonaisradioaktiivisuuden analyysi voi olla tarkoituksenmukaista. Jos näin on, kokonaisradioaktiivisuus on analysoitava kokoverestä ja plasmasta tai plasmasta ja punasoluista veri-plasmasuhteen laskemiseksi. Muissa tapauksissa tarkemmat tutkimukset, jotka edellyttävät perusyhdisteen ja/tai metaboliittien määrittämistä tai proteiineihin sitoutumisen arviointia, voivat olla tarpeen.

Muu kudoskinetiikka

53. Näiden tutkimusten tarkoituksena on tuottaa aikaan liittyvää tietoa, jotta myrkyllistä vaikutustapaa, biokertyvyyttä ja biopysyvyyttä koskeviin kysymyksiin voidaan vastata määrittämällä testikemikaalin pitoisuudet eri kudoksissa. Kudosten valinta ja arvioitavien aikapisteiden määrä määräytyvät käsiteltävän kudoksen ja testikemikaalia koskevan toksikologisen tietokannan mukaan. Tällaisten ylimääräisten kudoskinetiikkaa käsittelevien tutkimusten suunnittelussa on otettava huomioon kerätyt tiedot 37–40 kohdissa kuvatun mukaisesti. Näissä tutkimuksissa voidaan käyttää kerta-annosta tai toistuvaa annostelua. Käytettävä lähestymistapa on perusteltava yksityiskohtaisesti.

54. Muiden kudoskinetiikkaa käsittelevien tutkimusten toteuttamisen syitä voivat olla esimerkiksi seuraavat:

— Näyttö pidentyneestä puoliintumisajasta veressä, mikä viittaa siihen, että testikemikaali mahdollisesti kertyy eri kudoksiin.

— Tarve selvittää, onko vakaa tila saavutettu tietyissä kudoksissa (esimerkiksi toistuvan annostelun tutkimuksissa, sillä vaikka testikemikaalin näennäinen vakaa tila veressä on saavutettu, voi olla tarpeen varmistaa, että vakaa tila on saavutettu myös kohdekudoksissa).

55. Tämäntyyppisissä aikaan perustuvissa tutkimuksissa vähintään neljälle eläimelle annosta ja aikapistettä kohti on annettava sopiva annos testikemikaalia suun kautta, ja jakautumista valittuihin kudoksiin on seurattava ajan suhteen. Vain yhtä sukupuolta voidaan käyttää, ellei myrkyllisyyden ole havaittu olevan sukupuolikohtaista. Se, analysoidaanko kokonaisradioaktiivisuutta tai alkuperäistä kemikaalia ja/tai metaboliitteja, määräytyy myös käsiteltävän ongelman perusteella. Kudoksiin jakautuminen on arvioitava asianmukaisia tekniikoita käyttäen.

Entsyymi-induktio/-esto

56. Yhdessä tai useammassa jäljempänä luetellussa tapauksessa saatetaan tarvita tutkimuksia, joissa tarkastellaan entsyymi-induktion/-eston mahdollisia vaikutuksia tai tutkittavana olevan testikemikaalin biotransformaatiota.

1) Saatavilla oleva näyttö osoittaa, että testikemikaalin biotransformaation ja lisääntyneen myrkyllisyyden välillä on suhde.

2) Saatavilla olevat myrkyllisyystiedot osoittavat, että annoksen ja metabolian välinen suhde on ei-lineaarinen.

▼M4

3) Metaboliittien määritystutkimusten tulosten mukaan on määritetty mahdollisesti myrkyllinen metaboliitti, joka on voinut syntyä testikemikaalin indusoimaa entsyymireittiä pitkin.

4) Kun tavoitteena on selittää vaikutuksia, joiden oletetaan liittyvän entsyymi-induktion ilmiöihin.

5) Jos testikemikaalin metabolisessa profiilissa havaitaan toksikologisesti merkittäviä muutoksia joko *in vitro*- tai *in vivo* -kokeissa, jotka on tehty eri lajeilla tai eri olosuhteissa, kyseisen entsyymin (kyseisten entsyymien) luonnehdinta voi olla tarpeen (esimerkiksi I vaiheen entsyymit, kuten sytokromi P450 -riippuvaisen mono-oksigenaasijärjestelmän isoentsyymit, vaiheen II entsyymit, kuten sulfotransferaasin tai uridiinidifosfaattiglukuronosyylitransferaasin isoentsyymit tai muut oleelliset entsyymit). Näitä tietoja voidaan käyttää lajienvälisten ekstrapolointien asianmukaisuuden arvioinnissa.

57. Kun arvioidaan testikemikaaliin liittyviä muutoksia toksikokinetiikassa, on käytettävä sopivia tutkimusprotokollia, jotka on validoitu ja perusteltu asianmukaisesti. Esimerkinomaisiin tutkimussuunnitelmiin sisältyy leimaamattoman testikemikaalin toistuva annostelu, jonka jälkeen annetaan radioaktiivisesti leimattu kerta-annos päivänä 14, tai radioaktiivisesti leimatun kemikaalin toistuva annostelu ja näytteenotot päivinä 1, 7 ja 14 metaboliittien profiilien määrittelemiseksi. Radioaktiivisesti leimatun testikemikaalin toistuva annostelu voi tuottaa tietoa myös biokertyvyydestä (katso 26 kohta).

TÄYDENTÄVÄT TUTKIMUKSET

58. Tässä testimenetelmässä kuvattujen *in vivo* -kokeiden lisäksi tehtävistä täydentävistä tutkimuksista voidaan saada hyödyllistä tietoa testikemikaalin imeytymisestä, jakautumisesta, metaboliasta ja eliminoitumisesta tietyissä lajeissa.

***In vitro* -tietojen käyttö**

59. *In vitro* -tutkimuksissa, joissa käytetään asianmukaisia testijärjestelmiä, voidaan käsitellä useita testikemikaalin metaboliaan liittyviä kysymyksiä. Mahdollisten metaboliittien tutkimiseen voidaan käyttää maksasta eristettyjä tai kasvatettuja hepatosyyttejä ja subsellulaarisia fraktioita (esimerkiksi mikrosomeja ja sytosolia tai S9-fraktiota). Kohde-elimen, kuten keuhkojen, paikallinen metabolia voi olla tutkimisen arvoinen riskinarvioinnin kannalta. Näihin tarkoituksiin kannattaa hyödyntää kohdekudosten mikrosomaalisia fraktioita. Mikrosomeilla tehtävät tutkimukset voivat olla hyödyllisiä mahdollisten sukupuoleen ja elinkaaren vaiheeseen liittyvien erojen selvittämiseksi ja entsyymiparametrien (K_m ja V_{max}) luonnehtimiseksi, sillä niistä voi olla apua metabolian annosriippuvuuden ja altistustasojen välisen suhteen arvioimisessa. Lisäksi mikrosomit voivat olla hyödyllisiä, kun määritetään tiettyjä testikemikaalin metaboliaan osallistuvia mikrosomaalisia entsyymejä, joilla voi olla merkitystä lajienvälisessä ekstrapoloinnissa (katso myös 56 kohta). Biotransformaation mahdollista indusoitumista voidaan myös tutkia käyttämällä kyseisellä testikemikaalilla esikäsiteltyjen eläinten maksan subsellulaarisia fraktioita (esimerkiksi mikrosomeja ja sytosolia). Sitä voidaan tutkia myös *in vitro* hepatosyyttien induktiotutkimusten tai tiettyjen, oleellisia entsyymejä ilmentävien solulinjojen avulla. Tietyissä tilanteissa ja asianmukaisissa olosuhteissa voidaan harkita myös ihmisten kudoksista peräisin olevien subsellulaaristen fraktioiden käyttöä, kun määritetään biotransformaation mahdollisia lajien välisiä eroja. *In vitro* -tutkimusten tulokset voivat olla käyttökelpoisia myös fysiologiaan perustuvien toksikokineettisten mallien (5) kehittämisessä.

▼M4

60. Ihon kautta imeytymistä käsittelevistä *in vitro* -tutkimuksista saatetaan saada täydentäviä tietoja imeytymisen luonnehtimiseksi (6).

61. Kun käsitellään samanlaisia kysymyksiä kuin maksan mikrosomien yhteydessä, voidaan käyttää maksasoluista peräisin olevia primaarisia soluviljelmiä ja tuoreita kudosleikkeitä. Joissakin tapauksissa voi olla mahdollista ratkaista tiettyjä kysymyksiä käyttämällä solulinjoja, joiden on määritetty ilmentävän oleellista entsyymiä, tai yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotettuja solulinjoja. Tietyissä tapauksissa kannattaa tutkia tiettyjen sytokromi P450 -isotsyymien (esimerkiksi CYP1A1:n, 2E1:n, 1A2:n ja muiden) ja/tai II vaiheen entsyymien estoa ja induktiota perusyhdisteellä käyttäen *in vitro* -tutkimuksia. Näin hankituista tiedoista saattaa olla hyötyä rakenteeltaan samanlaisten yhdisteiden tutkimuksissa.

Myrkyllisyystutkimuksista peräisin olevien toksikokineettisten tietojen käyttö täydentävinä tietoina

62. Muissa myrkyllisyystutkimuksissa otettujen veri-, kudos- ja/tai eritenäytteiden analyysi voi tuottaa tietoa biologisesta hyötyosuudesta, plasmapitoisuuden muutoksista aikaan nähden (AUC, C_{max}), biokertyvyyspotentiaalista, puhdistumasta sekä sukupuoleen tai elinkaaren vaiheeseen liittyvistä muutoksista metaboliassa ja kinetiikassa.

63. Tutkimussuunnitelmassa voidaan tarkastella esimerkiksi seuraaviin seikkoihin liittyviä kysymyksiä: imeytymisen saturaatio, biotransformaatio- tai erittymisreitit suuremmilla annoksilla, uusien metaboliareittien toiminta suuremmilla annoksilla ja myrkyllisten metaboliittien rajoittuminen suurempiin annoksiin.

64. Muita vaaran arvioinnissa huomioon otettavia seikkoja voivat olla esimerkiksi seuraavat:

— Ikään liittyvä herkkyys, joka johtuu veri-aivoesteen ja munuaisten tilan eroista sekä detoksifikaatiokapasiteeteista

— Alapopulaation herkkyys, joka johtuu biotransformaatiokapasiteettien eroista tai muista toksikokineettisistä eroista

— Sikiön tai poikasen altistumisen laajuus (istukan läpi tai imetyksen kautta kulkeutuvat kemikaalit).

Toksikokineettisen mallintamisen käyttö

65. Toksikokineettiset mallit voivat olla hyödyllisiä vaaran ja riskinarvioinnin eri näkökohtien kannalta, esimerkiksi systeemisen altistuksen ja sisäisen kudosannoksen ennustamisessa. Mallien avulla voidaan käsitellä myös vaikutustapaan liittyviä erityiskysymyksiä. Mallit voivat olla myös perusteena lajienvälisen, altistusreittien ja annostusmallien ekstrapoloinnille sekä ihmisiin kohdistuvan riskin arvioinnille. Fysiologiaan perustuvien toksikokineettisten mallien, jotka koskevat tiettyä testikemikaalia ja tiettyä lajia, kehittämisessä hyödyllisiä tietoja ovat 1) jakaantumiskertoimet, 2) biokemialliset vakiot ja fysiologiset parametrit, 3) reittikohtaiset imeytymisparametrit ja 4) *in vivo* -kinetiikkatiedot mallin arviointia varten (esimerkiksi oleellisten (> 10 prosenttia) erittymisreittien puhdistumaparametrit, metabolian K_m- ja V_{max}-arvot). Mallin kehittämisessä käytetyt kokeelliset tiedot on tuotettava tieteellisesti pätevillä menetelmillä, ja mallin avulla saadut tulokset on validoitava. Testikemikaali- ja lajikohtaiset parametrit, kuten imeytymisasteet, verenkiertoon ja kudoksiin jakaantuminen ja metaboliset nopeusvakiot, määritetään usein siksi, että tilavapaiden (non-compartmental) tai fysiologiaan perustuvien mallien kehittäminen on helpompaa.

▼M4

TIEDOT JA RAPORTOINTI

66. On suositeltavaa, että tutkimusraportissa on sisällysluettelo.

Raportin rakenne

67. Raportin tulee sisältää tämän testimenetelmän kattamat tiedot, ja ne on järjestettävä eri osiin ja kohtiin seuraavasti:

Yhteenveto

68. Tässä tutkimusraportin osassa on oltava yhteenveto tutkimussuunnitelmasta ja kuvaus käytetyistä menetelmistä. Siinä on myös esitettävä keskeiset löydökset, jotka koskevat massatasetta, metaboliittien luonnetta ja määrää, kudosjäämiä, puhdistumanopeutta, biokertyvyyspotentiaalia, sukupuolten välisiä eroja jne. Yhteenveto on laadittava riittävän yksityiskohtaisesti, jotta löydöksiä voidaan arvioida.

Johdanto

69. Raportin tämän osan tulee sisältää tutkimuksen tavoitteet, perustelut ja tutkimussuunnitelma sekä asianmukaiset viitteet ja taustatiedot.

Aineet ja menetelmät

70. Raportin tässä osassa on esitettävä yksityiskohtainen kuvaus kaikista asianmukaisista tiedoista seuraavasti:

a) Testikemikaali

Tässä alakohdassa on esitettävä testikemikaalista seuraavat tunnistetiedot: kemiallinen nimi, molekyylirakenne, sen kemiallisen koostumuksen laadullinen ja määrällinen määritys, kemiallinen puhtaus ja epäpuhtauksien tyyppi ja määrät, mikäli mahdollista. Myös seuraavat tiedot on esitettävä: fysikaalis-kemialliset ominaisuudet sekä fysikaalinen olomuoto, väri, kokonaisliukoisuus ja/tai jakaantumiskerroin, stabiliteetti ja tarvittaessa syövyttävyys. Mikäli tarpeen, myös isomeerejä koskevat tiedot on esitettävä. Jos testikemikaali on leimattu radioaktiivisella aineella, tähän alakohtaan on sisällyttävä myös seuraavat tiedot: radionuklidin tyyppi, leiman sijainti, spesifinen aktiivisuus ja radiokemiallinen puhtaus.

Kantaja-aineen, laimenteiden, suspendoivien aineiden ja emulgointiaineiden tai muiden testikemikaalin annostelussa käytettyjen aineiden tyyppi tai kuvaus niistä on ilmoitettava.

b) Koe-eläimet

Tässä alakohdassa on esitettävä tiedot koe-eläimistä, mukaan luettuina seuraavat seikat: lajin ja kannan valinta sekä perustelut, eläinten ikä tutkimuksen alkaessa, sukupuoli ja paino, terveydentila ja eläinten hoito.

c) Menetelmät

Tässä alakohdassa on esitettävä yksityiskohdat tutkimussuunnitelmasta ja käytetystä menetelmästä. Alakohdassa on esitettävä myös seuraavat tiedot:

1) Perustelut altistumisreitin ja altistusolosuhteiden muuttamiselle, mikäli tarpeen

▼M4

2) Perustelut annostasojen valinnalle

3) Kuvaus seurantatutkimusten kokeellisissa osioissa käytetyistä esitutkimuksista, mikäli tarpeen. Tiedot vahvistava esitutkimus on toimitettava.

4) Tiedot siitä, miten annosteluliuos valmistettiin, sekä mahdollisesti käytetyn liuottimen tai kantaja-aineen tyyppi

5) Testiryhmien lukumäärä ja kussakin ryhmässä olleiden eläinten lukumäärä

6) Annostelutasot ja tilavuus (ja annoksen spesifinen aktiivisuus, jos käytettiin radioaktiivista ainetta)

7) Antoreitti (-reitit) ja -menetelmät

8) Annostelutiheys

9) Paastojakso (jos käytetty)

10) Eläinkohtainen kokonaisradioaktiivisuus

11) Eläinten käsittely

12) Näytteiden kerääminen ja käsittely

13) Metaboliittien erottelussa, kvantifioinnissa ja määrittämisessä käytetyt analyysimenetelmät

14) Käytettyjen menetelmien havaitsemisrajat

15) Muut käytetyt kokeelliset mittaukset ja menettelyt (sekä metaboliittien analysoinnissa käytettyjen menetelmien validointi)

d) Tilastollinen analyysi

Jos tutkimustulosten analysoinnissa käytetään tilastollista analyysia, analyysimenetelmästä ja käytetystä tilasto-ohjelmasta on esitettävä tarpeeksi tietoa, jotta puolueeton arvioija/tilastotieteilijä voi arvioida ja rekonstruoida analyysin uudestaan.

Järjestelmien mallintamistutkimusten (kuten fysiologiaan perustuvat toksikokineettiset mallit) osalta on esitettävä täydellinen kuvaus mallista, jotta malli voidaan rekonstruoida ja validoida riippumattomasti (katso 65 kohta ja lisäys: Määritelmät).

Tulokset

71. Yhteenveto kaikista tiedoista on esitettävä taulukossa asianmukaisen tilastollisen arvioinnin kanssa, ja tiedot on kuvattava tämän osan tekstissä. Yhteenveto radioaktiivisuuden laskentatiedoista on esitettävä tutkimuksen kannalta tarkoituksenmukaisella tavalla, yleensä mikrogramman tai milligramman ekvivalentteina näytteen massaa kohti, joskin myös muita yksiköitä voidaan käyttää. Tämän osan on sisällettävä kaavioita, jotka kuvaavat löydöksiä, jäljennöksiä edustavista kromatografia- ja spektrometriatiedoista, metaboliittien määrittämistä/kvantifiointia sekä ehdotettuja metaboliareittejä metaboliittien molekyylirakenne mukaan luettuna. Lisäksi tämän osan on sisällettävä seuraavat tiedot, mikäli tarpeen:

1) Radioaktiivisuuden määrä ja saanto virtsassa, ulosteessa, uloshengitysilmassa sekä häkin pesuvedessä olevassa virtsassa ja ulosteessa.

— Ihotutkimusten osalta on sisällytettävä myös tiedot käsitellyltä iholta talteenotetusta testikemikaalista, ihohuuhteluista ja ihon jäännösradioaktiivisuudesta, mukaan luettuina laitteet ja metaboliayksikkö sekä ihonpesututkimuksen tulokset. Katso lisätietoja 74–77 kohdasta.

▼M4

— Inhalaatiotutkimusten osalta on sisällytettävä myös tiedot testikemikaalin saannosta keuhkoista ja nenän kudoksista (8). Katso lisätietoja 78 kohdasta.

2) Kudoksiin jakautuminen (ilmoitettava prosenttiosuutena annetusta annoksesta ja pitoisuudesta (mikrogramman ekvivalentteina kudosgrammaa kohti)) ja kudoksista verenkiertoon tai kudoksista plasmaan -suhteet.

3) Jokaisen tutkimuksen perusteella laadittu ainetase sekä kudosten ja eritteiden analyysi.

4) Plasmapitoisuudet ja toksikokineettiset parametrit (biologinen hyötyosuus, AUC, Cmax, Tmax, puhdistuma, puoliintumisaika) sen jälkeen, kun kemikaalia on annettu oleellista altistumisreittiä (oleellisia altistumisreittejä) pitkin.

5) Testikemikaalin imeytymisnopeus ja -laajuus sen jälkeen, kun sitä on annettu oleellista altistumisreittiä (oleellisia altistumisreittejä) pitkin.

6) Eritteistä talteenotettujen testikemikaalin ja metaboliittien määrät (ilmoitetaan prosenttiosuutena annetusta annoksesta).

7) Viittaus liitteessä esitettäviin tietoihin, jotka sisältävät jokaisen eläimen tiedot kaikista mittaustuloksista (esimerkiksi annoksen annostelu, saannon prosenttiosuus, pitoisuudet, toksikokineettiset parametrit jne.)

8) Kuva ehdotetuista metaboliareiteistä ja metaboliittien molekyylirakenteista.

Pohdinta ja päätelmät

72. Tässä osassa kirjoittajan (kirjoittajien) on

1) esitettävä ehdotettu metaboliareitti, joka perustuu metaboliaa koskeviin tuloksiin ja testikemikaalin jakautumiseen eri komponentteihin

2) pohdittava mahdollisia lajien ja sukupuolten välisiä eroja testikemikaalin jakautumisessa ja/tai biotransformaatiossa

3) taulukoitava seuraavat tiedot ja pohdittava niitä: metaboliittien määrittäminen ja niiden lukumäärä, puhdistumanopeudet, biokertyvyyspotentiaali sekä perusaineen ja/tai metaboliitin (metaboliittien) kudosjäämäpitoisuus ja toksikokineettisten parametrien mahdolliset annosriippuvaiset muutokset, mikäli tarpeen

4) sisällytettävä tähän osaan kaikki oleelliset myrkyllisyystutkimusten aikana saadut toksikokineettiset tiedot

5) esitettävä ytimekkäät päätelmät, joita tutkimuksen tulokset tukevat

6) lisättävä osia (jos tarpeen).

73. Muita osia tulee käyttää tutkimusta tukevien kirjallisuustietojen, taulukoiden, kuvien, liitteiden jne. lisäämiseksi raporttiin.

▼M4

VAIHTOEHTOISET ALTISTUMISREITIT

Ihon kautta altistus

Ihon kautta käsittely

74. Tässä osassa esitetään spesifistä tietoa ihon kautta annetun testikemikaalin toksikokinetiikan tutkimisesta. Ihon kautta imeytymisen osalta on luettava tämän liitteen luku B.44 [Ihon kautta imeytyminen: *in vivo* -menetelmä (9)]. Muiden tutkittavien ominaisuuksien, kuten jakautumisen ja metabolian, osalta voidaan käyttää tätä testimenetelmää B.36. Ihon kautta käsittelyssä testikemikaalista tulee käyttää yhtä tai useampaa annostasoa. Testikemikaalin (testikemikaalia sisältävä laimentamaton tai laimennettu materiaali tai formulaatio, joka applikoidaan iholle) on oltava sama kuin se, jolle ihmiset tai muut kohdelajit voivat altistua, tai kyseisen kemikaalin realistinen korvike. Annostaso(t) on valittava tämän testimenetelmän 20–26 kohdan mukaisesti. Ihon kautta annettavan annoksen valinnassa voidaan ottaa huomioon seuraavat seikat: oletettu ihmisten altistuminen ja/tai annokset, joissa on havaittu myrkyllisyyttä muissa ihon kautta välittyvää myrkyllisyyttä koskevissa tutkimuksissa. Ihon kautta annettava annos (annettavat annokset) on tarvittaessa liuotettava sopivaan kantaja-aineeseen, ja annosteltavan määrän on oltava halutun annoksen kannalta riittävä. Juuri ennen kokeen alkua eläinten selästä poistetaan karvapeite leikkaamalla. Karvapeite voidaan myös ajella, mutta se tulee tehdä noin vuorokautta ennen testin alkua. Karvapeitettä poistettaessa on varottava vahingoittamasta ihoa, sillä se voi muuttaa ihon läpäisykykyä. Noin 10 prosenttia ruumiin pinnasta on oltava ajeltuna, jotta siihen voidaan annostella testikemikaalia. Erittäin myrkyllisten kemikaalien yhteydessä tämä alue voi olla pienempi kuin 10 prosenttia, mutta mahdollisimman suuri osa alueesta on peitettävä ohuella ja yhtenäisellä kerroksella testikemikaalia. Samaa käsittelyaluetta on käytettävä kaikissa testiryhmissä, joissa tutkitaan ihon kautta altistusta. Käsitellyt alueet on suojattava sopivalla paikalleen kiinnitettävällä suojuksella. Eläimet on pidettävä omissa häkeissään.

75. Ihonpesututkimus on tehtävä, jotta voidaan arvioida, mikä määrä testikemikaalin annetusta annoksesta voi poistua iholta, kun käsitelty ihoalue pestään miedolla saippualla ja vedellä. Tästä tutkimuksesta voi myös olla apua määritettäessä massatasetta, kun testikemikaali annostellaan ihon kautta. Tässä ihonpesututkimuksessa on annettava kerta-annos testikemikaalia kahdelle eläimelle. Annostaso valitaan tämän testimenetelmän 23 kohdan mukaisesti (katso lisätietoja ihokontaktiajasta myös 76 kohdasta). Pesuvesistä talteenotetut testikemikaalimäärät on määritettävä, jotta voidaan arvioida sitä, miten tehokkaasti pesutoimenpide poistaa testikemikaalia.

76. Ellei syövyttävyys estä sitä, testikemikaalia on pidettävä iholla vähintään kuusi tuntia. Kun suojus poistetaan, käsitelty alue on pestävä ihonpesututkimuksessa kuvatun menettelyn mukaisesti (katso 75 kohta). Sekä suojuksesta että pesuvesistä on analysoitava testikemikaalin jäämät. Tutkimuksen päättyessä jokainen eläin on lopetettava humaanisti viitteen (2) mukaisesti, ja käsitelty ihoalue on irrotettava. Käsitellystä ihosta on analysoitava tarkoituksenmukainen osa testikemikaalijäämien (radioaktiivisuuden) määrittämiseksi.

77. Lääkkeiden toksikokineettisessä arvioinnissa saatetaan tarvita muita toimenpiteitä asianmukaisen sääntelyjärjestelmän mukaisesti.

▼M4

Inhalaatio

78. Testikemikaalista on käytettävä yhtä pitoisuutta (tai useampaa, mikäli tarpeen). Pitoisuus (pitoisuudet) on valittava tämän testimenetelmän 20–26 kohdan mukaisesti. Inhalaatiokäsittelyt on tehtävä käyttäen nenäkartiota tai vain pää -laitetta muita altistumisreittejä pitkin tapahtuvan imeytymisen estämiseksi (8). Jos käytetään muita inhalaatioaltistusolosuhteita, niiden perustelut on dokumentoitava. Inhalaatioaltistuksen kesto on määriteltävä; yleensä altistus kestää 4–6 tuntia.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73–81.

4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25–40,

5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400–411.

6) Tämän liitteen luku B.45 (Ihon kautta imeytyminen: *in vitro* -menetelmä)

7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Tämän liitteen luku B.44 (Ihon kautta imeytyminen: *in vivo* -menetelmä)

10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

ADME: Lyhennesana englanninkielisistä sanoista ”Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion” (imeytyminen, jakautuminen, metabolia ja erittyminen).

Ainetase: Katso ”Massatase”.

Antoreitti: (suun kautta, suonensisäisesti, ihon kautta, hengitysteiden kautta jne.): Tarkoittaa sitä tapaa, jolla kemikaalit annostellaan elimistöön (esimerkiksi suun kautta ruokintaletkulla, suun kautta ravinnon seassa, hengitysteiden kautta, suonensisäisesti jne.).

AUC: (Area under the plasma concentration-time curve eli plasman pitoisuus-aikakäyrän alle jäävä pinta-ala): Testikemikaalin pitoisuutta plasmassa ajan suhteen kuvaavan käyrän alapuolinen pinta-ala. Se edustaa elimistöön imeytyneen testikemikaalin kokonaismäärää ennalta määritetyn ajanjakson aikana. Lineaarisissa olosuhteissa AUC (ajasta nolla äärettömyyteen saakka) on verrannollinen elimistöön imeytyneen testikemikaalin kokonaismäärään imeytymisnopeudesta riippumatta.

Autoradiografia: (koko kehon autoradiografia): Käytetään radioaktiivisen testikemikaalin sijainnin määrittämiseen kudoksessa (laadullisesti ja/tai määrällisesti). Tässä tekniikassa käytetään röntgenkuvausfilmiä tai nykyään ennemminkin digitaalista kuvantamista fosforilevylle radioaktiivisesti leimattujen molekyylien tai niiden fragmenttien saamiseksi näkyviin tallentamalla tutkittavan kohteen lähettämää säteilyä. Elinten dissekointiin verrattuna määrällisestä koko kehon autoradiografiasta voi olla joitakin etuja arvioitaessa testikemikaalin jakautumista ja määritettäessä radioaktiivisen materiaalin kokonaissaantoa ja hajoamista kudoksissa. Eräs merkittävä etu on esimerkiksi se, että sitä voidaan käyttää värillisiä eläimiä koskevassa mallissa, jolloin voidaan arvioida testikemikaalin ja melaniinin välistä mahdollista suhdetta, sillä melaniini voi sitoa tiettyjä molekyylejä. Vaikka tämä tekniikka voi olla hyödyllinen koko kehoon kohdistuvissa arvioinneissa sellaisten sitoutumispaikkojen osalta, joiden kapasiteetti on suuri mutta affiniteetti pieni, se voi olla rajallinen tunnistettaessa tiettyjä kohdepaikkoja, esimerkiksi reseptoreihin sitoutumisen paikkoja, jolloin havaitseminen edellyttää suhteellisen suurta resoluutiota ja herkkyyttä. Autoradiografiaa käytettäessä kokeet, joiden tavoitteena on määrittää annostellun yhdisteen massatase, on tehtävä kudoksiin jakautumiskokeesta erillisessä ryhmässä tai erillisenä tutkimuksena, jossa kaikki eritteet (joihin voi sisältyä myös uloshengitysilma) ja kokonaiset ruumiit homogenisoidaan ja analysoidaan nestetuikelaskennalla.

Biokertyvyys: Katso ”Kertyvyys”.

Biologinen hyötyosuus: Annetun annoksen se fraktio, joka pääsee systeemiseen verenkiertoon tai fysiologiseen vaikutuspaikkaan. Testikemikaalin biologisella hyötyosuudella tarkoitetaan yleensä perusyhdistettä, mutta sillä voidaan tarkoittaa myös sen metaboliitteja. Se koskee ainoastaan yhtä kemiallista muotoa. *Huomio:* biologinen hyötyosuus ja imeytyminen eivät ole sama asia. Esimerkiksi suun kautta imeytymisen (jolloin ainetta on suolen seinämässä ja porttiverenkierrossa) ja biologisen hyötyosuuden (jolloin ainetta on systeemisessä verenkierrossa ja kudoksissa) välinen ero voi syntyä esimerkiksi kemiallisesta hajoamisesta, joka johtuu aineen metabolisoitumisesta suolen seinämässä, ulosvirtauskuljetuksesta takaisin suoliston onteloon tai presysteemisestä metaboliasta maksassa (10). Myrkyllisen komponentin (perusyhdisteen tai metaboliitin) biologinen hyötyosuus on kriittinen parametri ihmisiin kohdistuvan riskin arvioinnissa (ekstrapolointi suuresta pieneen annokseen tai reitistä toiseen), jotta ulkoisista NOAEL- tai BMD-arvoista (sovellettu annos) voidaan johtaa sisäinen arvo. Suun kautta annostelun yhteydessä aiheutuvien maksavaikutusten osalta riittää suun kautta imeytyminen. Kaikkien muiden vaikutusten, jotka ilmenevät muualla kuin aineen antokohdassa, biologinen hyötyosuus on kuitenkin imeytymistä luotettavampi parametri käytettäväksi riskinarvioinnissa.

Biopysyvyys: Katso ”Pysyvyys”.

Biotransformaatio: Tutkittavan testikemikaalin (yleensä entsymaattinen) kemiallinen muuntuminen eri kemikaaliksi elimistössä. ”Metabolian” synonyymi.

$\mathbf{C_{max}}$: Joko enimmäis- tai huippupitoisuus veressä (plasmassa/seerumissa) annostelun jälkeen tai enimmäis- tai huippuerittyminen (virtsaan tai ulosteeseen) annostelun jälkeen.

▼M4

Detoksifikaatioreitit: Vaihesarja, joka johtaa myrkyllisten kemikaalien eliminoitumiseen kehosta joko metabolisen muuntumisen tai erittymisen kautta.

Eksogeeninen: Organismin tai järjestelmän ulkopuolella aiheutettu tai tuotettu (asia).

Ekstrapolointi: Yhden tai useamman arvon päättely sen perusteella, mitä tiedetään tai mitä on havaittu.

Entsymaattiset parametrit: K_m: Michaelisin vakio ja V_{max}: enimmäisnopeus.

Entsyymit/isotsyymit: Kemiallisia reaktioita katalysoivia (nopeuttavia) proteiineja. Isotsyymit ovat entsyymejä, jotka katalysoivat samanlaisia kemiallisia reaktioita mutta joiden aminohapposekvenssi on erilainen.

Erittyminen: Prosessi(t), jonka (joiden) kautta annosteltu testikemikaali ja/tai sen metaboliitit poistuvat kehosta.

Herkkyys: Menetelmän tai välineen kyky erotella mittausvasteita siten, että ne edustavat kyseisen muuttujan eri tasoja.

Huippupitoisuus veressä (plasmassa/seerumissa): Veren (plasman/seerumin) enimmäis- tai huippupitoisuus annostelun jälkeen (katso myös ”C_{max}”).

Imeytyminen: Kemikaalien siirtyminen kudoksiin tai niiden läpi. Imeytymisellä tarkoitetaan perusyhdistettä ja kaikkia sen metaboliitteja. Sitä ei tule sekoittaa biologinen hyötyosuus -käsitteeseen.

Induktio/entsyymi-induktio: Ympäristön ärsykkeen tai induktorimolekyylin aiheuttama entsyymisynteesi.

Interpolointi: Kohdekemikaaliin liittyvän ominaisuuden ennustamisessa käytetään tietoja yhden tai useamman kemikaalin ominaisuuksista.

Jakaantumiskerroin: Tunnetaan myös nimellä jakautumiskerroin; se on kahdessa liuottimessa olevan kemikaalin erilaisen liukoisuuden mittari.

Jakautuminen: Testikemikaalin ja sen johdannaisten leviäminen koko organismiin.

Järjestelmien mallintaminen (fysiologiaan perustuva toksikokinetiikka, farmakokinetiikkaan, fysiologiaan perustuva farmakokinetiikka, biologiaan perustuva jne.): Abstrakti malli, jossa käytetään matemaattista kieltä kuvaamaan järjestelmän käyttäytymistä.

Kertyvyys (biokertyvyys): Testikemikaalin määrän lisääntyminen kudoksissa ajan myötä (yleensä rasvakudoksissa toistuvan altistuksen jälkeen). Jos testikemikaalia syötetään elimistöön enemmän kuin sitä eliminoituu, organismiin kertyy testikemikaalia, jolloin saatetaan saavuttaa myrkyllisiä testikemikaalipitoisuuksia.

Kohdekudos: Kudos, jossa myrkyllisen aineen pääasiallinen haittavaikutus ilmenee.

Kudoksiin jakautuminen: Testikemikaalin palautuva liike elimistön yhdestä paikasta toiseen. Kudoksiin jakautumista voidaan tutkia elinten dissektion, homogenisoinnin, polttamisen tai nestetuikelaskennan avulla tai koko kehon laadullisella ja/tai määrällisellä autoradiografialla. Edellinen on hyödyllinen määritettäessä pitoisuutta ja saantoa kudoksista sekä jäljellä olevasta ruumiista samoilla eläimillä, mutta sen tarkkuus voi olla riittämätön kaikkien kudosten osalta ja sen kokonaissaanto voi olla tarkoituksenmukaista pienempi (< 90 prosenttia). Katso jälkimmäisen määritelmä edeltä.

▼M4

Lineaarisuus / lineaarinen kinetiikka: Kinetiikan kannalta prosessi on lineaarinen silloin, kun kaikki eri osien väliset siirtymisnopeudet ovat verrannollisia määriin tai pitoisuuksiin nähden (eli ensimmäisen kertaluvun reaktio). Tällöin puhdistuma- ja jakautumistilavuudet ovat vakioita, kuten myös puoliintumisajat. Saavutetut pitoisuudet ovat verrannollisia annostelumäärään (altistukseen), ja kertymisen ennustaminen on helpompaa. Lineaarisuutta/ei-lineaarisuutta voidaan arvioida vertailemalla oleellisia parametreja (kuten AUC-arvoa) eri annosten tai kerrallisen ja toistuvan altistuksen jälkeen. Annosriippuvuuden puute saattaa viitata siihen, että yhdisteen metaboliaan osallistuvat entsyymit ovat saturoituneet. AUC-arvon suureneminen toistuvan altistuksen jälkeen (verrattuna kerta-altistukseen) saattaa viitata metabolian estymiseen, ja AUC-arvon pieneneminen saattaa puolestaan viitata metabolian indusoitumiseen [katso myös (11)].

Mallien validointi: Prosessi, jossa arvioidaan, kuvaako jokin malli käytettävissä olevia toksikokineettisiä tietoja yhdenmukaisesti. Malleja voidaan arvioida vertailemalla mallin avulla saatuja ennusteita ja kokeellisia arvoja yhteiseen riippumattomaan muuttujaan (esimerkiksi aikaan). Arvioinnin laajuus on perusteltava suhteessa mallin käyttötarkoitukseen.

Massatase: Järjestelmään tulevan ja siitä poistuvan testikemikaalin määrä.

Metabolia: ”Biotransformaation” synonyymi.

Metaboliitit: Metabolian tai metabolisten prosessien tuotteet.

Myrkyllisyyden mekanismi / myrkyllisyyden vaikutustapa: Vaikutusmekanismi tarkoittaa tiettyjä biokemiallisia interaktioita, joiden kautta testikemikaalin vaikutus syntyy. Vaikutustapa tarkoittaa yleisempiä reittejä, joiden kautta testikemikaalin myrkyllisyys aiheutuu.

Osa: Kehon, kudoksen tai solun rakenteellinen tai biokemiallinen osio (tai yksikkö), joka on muista osista erillinen.

Puhdistumanopeus: Määrällinen mittari, jolla mitataan sitä nopeutta, jolla testikemikaali poistuu verestä, plasmasta tai tietystä kudoksesta aikayksikköä kohti.

Puoliintumisaika ($t_{1/2}$): Aika, jossa testikemikaalin pitoisuus pienenee puoleen tietyssä osassa. Yleensä sillä tarkoitetaan plasmapitoisuutta tai testikemikaalin määrää koko kehossa.

Pysyvyys (biopysyvyys): Kemikaalin pitkäaikainen läsnäolo (biologisessa järjestelmässä) sen vuoksi, että se hajoaa/eliminoituu hitaasti.

Reseptorien mikroskooppinen autoradiografia (tai reseptorien mikroautoradiografia): Tätä tekniikkaa voidaan käyttää tutkittaessa tiettyjen kudospaikkojen tai solupopulaatioiden välistä ksenobioottista vuorovaikutusta, esimerkiksi reseptoreihin sitoutumista tai tiettyä vaikutustapaa koskevissa tutkimuksissa, joissa voidaan tarvita suurta resoluutiota ja suurta tarkkuutta, mikä taas ei ole mahdollista koko kehon autoradiografiassa.

Sappieritys: Erittyminen sappiteiden kautta.

Saturaatio: Tila, jolloin yksi tai useammin kineettinen prosessi (esimerkiksi imeytyminen, metabolia tai puhdistuma) on suurimmillaan (eli saturoitunut).

▼**M4**

Suun kautta imeytyminen: Prosenttiosuus antopaikasta (esimerkiksi maha-suolikanavasta) imeytyneestä testikemikaaliannoksesta. Tätä kriittistä parametria voidaan käyttää, jotta saadaan selville, mikä fraktio annostellusta testikemikaalista pääsee porttilaskimoon ja sen jälkeen maksaan.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu kemikaali tai seos.

$\mathbf{T_{max}}$: C_{max}-arvon saavuttamiseen tarvittava aika.

Toksikokinetiikka (farmakokinetiikka): Kemikaalien imeytymistä, jakautumista, metaboliaa ja erittymistä aikaan nähden käsittelevä tutkimus.

Vakaan tilan pitoisuus veressä (plasmassa): Avoimen järjestelmän tasapainotila, jossa kaikki järjestelmään vaikuttavat tekijät ja vastakkaiset tekijät ovat tasapainossa siten, että sen kaikkien komponenttien pitoisuus on vakaa, vaikka aine virtaa järjestelmän läpi.

▼B

B.37. **ORGANOFOSFAATTIEN AIHEUTTAMA VIIVÄSTYNYT NEUROTOKSISUUS AKUUTIN ALTISTUKSEN JÄLKEEN**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Aineiden toksisten vaikutusten arvioinnissa on tärkeää ottaa huomioon mahdollisuus, että tietyt aineluokat voivat aiheuttaa erityistä neurotoksisuutta, jota ei ehkä todeta muissa toksisuuskokeissa. Tiettyjen organofosfaattien on havaittu aiheuttavan viivästynyttä neurotoksisuutta, ja niitä tulisi pitää mahdollisina tutkimuskohteina.

Viivästynyttä polyneuropatiaa aiheuttavat aineet voidaan tunnistaa *in vitro* -seulontatesteillä. Negatiiviset tulokset näistä tutkimuksista eivät kuitenkaan todista, ettei testiaine ole neurotoksinen.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa 8.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Organofosfaatteja ovat varauksettomat organofosfaattiesterit, tioesterit tai organofosfori-, organofosfoni- tai organofosforamidihappoanhydridit tai samantyyppisten fosforotioidi-, fosfonotioidi- tai fosforotioamidihappoanhydridit tai muut tässä aineluokassa joskus tavattavat aineet, jotka voivat aiheuttaa viivästynyttä neurotoksisuutta.

Viivästynyt neurotoksisuus on oireryhmä, johon liittyy ataksian, selkäytimen ja ääreishermon distaalisten aksonopatioiden pitkittynyt viivästynyt ilmeneminen ja neuropatian kohde-esteraasin (NTE) esto ja vanheneminen hermokudoksessa.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuainetta voidaan testata positiivisella verrokkiryhmällä sen osoittamiseksi, ettei testatun lajin vaste muutu laboratoriokoeolosuhteissa merkitsevästi.

Yksi esimerkki laajalti käytetystä neurotoksisesta aineesta on tri-o-tolyylifosfaatti (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS-nimistö: fosforihappo, tris(2-metyylifenyyli)esteri), tunnettu myös nimellä tris-o-kresyylifosfaatti.

1.4 KOEMENETELMÄN PERIAATE

Testiaine annostellaan kerta-annoksena suun kautta kanoille, joita on suojeltu akuuteilta kolinergisiltä vaikutuksilta silloin kun se on ollut tarkoituksenmukaista. Eläimiä havainnoidaan 21 päivän ajan käyttäytymispoikkeavuuksien, ataksian ja paralyysin suhteen. Kustakin ryhmästä satunnaisesti valituille kanoille tehdään biokemialliset määritykset, erityisesti neuropatian kohde-esteraasin (NTE) esto, yleensä 24 ja 48 tunnin kuluttua annostelusta. Kahdenkymmenenyhden päivän kuluttua altistuksesta loput kanat lopetetaan ja valitut hermokudokset tutkitaan histopatologisesti.

▼B

1.5 KOEMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1 **Valmistelut**

Terveet nuoret täysikasvuiset kanat, joilla ei ole häiritseviä virussairauksia, lääkitystä eikä käynnin poikkeavuuksia, jaetaan satunnaisotannalla koe- ja verrokkiryhmiin ja niitä totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen alkua.

Kokeessa käytettävien testihäkkien on oltava tarpeeksi tilavia, jotta kanat voivat liikkua vapaasti ja käynnin havainnointi käy helposti.

Testiainetta pitäisi yleensä annostella suun kautta mahaletkun avulla, liivatekapseleina tai vastaavalla menetelmällä. Nesteet voidaan antaa laimentamattomina tai liuotettuna sopivaan vehikkeliin, kuten maissiöljyyn. Kiinteät aineet tulee mahdollisuuksien mukaan liuottaa, koska suuret määrät kiinteää ainetta liivatekapseleissa eivät välttämättä imeydy tehokkaasti. Muiden kuin vesipitoisten vehikkelien toksiset ominaisuudet on oltava tiedossa ja jos ne eivät ole, on ne määritettävä ennen koetta.

1.5.2 **Koeolosuhteet**

1.5.2.1 *Koe-eläimet*

Kokeessa suositellaan käytettäväksi nuoria täysikasvuisia kanoja *(Gallus gallus domesticus),* jotka ovat iältään 8–12 kuukautta. Kanojen tulee olla normaalikokoisia, -lajisia ja -kantaisia ja mieluiten kasvatettu oloissa, joissa ne ovat voineet liikkua vapaasti.

1.5.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Kokeessa tulee käyttää koeryhmän lisäksi yhtä vehikkeliä saavaa verrokkiryhmää ja yhtä positiivista verrokkiryhmää. Vehikkeliä saavaa verrokkiryhmää tulee käsitellä täsmälleen samoin kuin koeryhmää testiaineen annostelua lukuun ottamatta.

Kussakin ryhmässä tulee olla riittävä määrä lintuja, jotta vähintään kuusi lintua voidaan lopettaa biokemiallisia määrityksiä varten (kolme kanaa kahtena eri ajankohtana) ja kuusi lintua säilyy hengissä 21 päivän havaintojakson ajan patologisia tutkimuksia varten.

Positiivista verrokkiryhmää voidaan tutkia samanaikaisesti tai se voi olla tuore historiallinen verrokkiryhmä. Siinä on oltava vähintään kuusi kanaa, joita on käsitelty tunnetulla viivästynyttä neurotoksisuutta aiheuttavalla aineella. Näistä kuudesta kanasta kolmelle tehdään biokemialliset määritykset ja kolmelle patologiset tutkimukset. Historiallisten tietojen ajoittaista päivitystä suositellaan. Uusia positiivisia kontrollitietoja pitäisi kehittää, kun kokeen suorittava laboratorio muuttaa joitakin olennaisia seikkoja koekäytännössä (esim. kanta, ravinto, elinolosuhteet).

▼B

1.5.2.3 *Annostasot*

Päätutkimuksessa käytettävä annostaso on määritettävä alustavassa tutkimuksessa, johon sisältyy tarkoituksenmukainen määrä kanoja ja annostasoryhmiä. Jonkinasteinen letaliteetti alustavassa tutkimuksessa on tyypillisesti välttämätöntä riittävän annoksen määrittämiseksi päätutkimusta varten. Akuuttien kolinergisten vaikutusten aiheuttaman kuoleman estämiseksi voidaan kanoille antaa atropiinia tai muuta suoja-ainetta, joka ei tiettävästi vaikuta viivästyneisiin neurotoksisiin vasteisiin. Testiaineiden ei-letaali enimmäisannos voidaan määrittää erilaisilla koemenetelmillä (ks. menetelmä B.1 bis). Kanoja koskevat historialliset tiedot tai muut toksikologiset tiedot voivat helpottaa annosten valintaa.

Päätutkimuksen testiaineen annostason tulee olla mahdollisimman korkea ottaen huomioon alustavan annosvalintatutkimuksen tulokset ja 2 000 mg/kg:n yläraja-annos. Mahdollisesti ilmenevä kuolleisuus ei saisi olla niin laajaa, etteikö riittävä määrä eläimiä säilyisi hengissä 21. päivänä tehtäviä biokemiallisia (kuusi eläintä) ja histologisia (kuusi eläintä) tutkimuksia varten. Atropiinia tai muuta suoja-ainetta, jotka eivät tiettävästi vaikuta viivästyneisiin neurotoksisiin vasteisiin, tulisi käyttää akuuteista kolinergisistä vaikutuksista johtuvien kuolemien estämiseksi.

1.5.2.4 *Raja-annoskoe*

Jos kokeessa ei vähintään 2 000 mg/kg/vrk:n annostasolla tässä tutkimuksessa kuvatuilla toimenpiteillä todeta havaittavia toksisia vaikutuksia ja jos toksisuutta ei ole odotettavissa rakenteellisesti samantyyppisistä aineista olevien tietojen perusteella, tutkimusta suuremmalla annoksella ei pidetä tarpeellisena. Raja-annoskoe voidaan tehdä paitsi silloin kun odotettavissa oleva altistus ihmisellä viittaa tarpeeseen käyttää korkeampaa annostasoa.

1.5.2.5 *Havainnointijakso*

Havainnointijakso kestää 21 päivää.

1.5.3 **Kokeen suorittaminen**

Kun eläimille on annettu suoja-ainetta akuutista kolinergisestä vaikutuksesta johtuvan kuoleman estämiseksi, annostellaan testiaine kerta-annoksena.

1.5.3.1 Yleishavainnot

Havainnoinnin tulee alkaa heti käsittelyn alettua. Kaikkia kanoja tulee havainnoida tarkoin useita kertoja kahden ensimmäisen päivän aikana ja sen jälkeen vähintään kerran päivässä 21 päivän ajan tai siihen asti kunnes eläin aiotaan lopettaa. Kaikki toksisuusoireet tulee kirjata muistiin, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, tyyppi, voimakkuus ja kesto. Ataksia tulee mitata vähintään neliportaisella ordinaaliasteikolla, ja paralyysi tulee kirjata muistiin. Patologisia tutkimuksia varten valitut kanat on päästettävä häkistä vähintään kahdesti viikossa ja pakotettava joksikin aikaa liikkumaan, kuten kiipeämään tikkaita, vähäisten toksisten vaikutusten havainnoinnin helpottamiseksi. Kuolemaisillaan olevat ja voimakasta kärsimystä tai kipua osoittavat eläimet tulee poistaa heti kun niiden tila huomataan ja lopettaa humaanilla tavalla ja niille tulee tehdä ruumiinavaus.

▼B

1.5.3.2 Ruumiinpaino

Kaikki kanat on punnittava juuri ennen testiaineen annostelua ja vähintään kerran viikossa sen jälkeen.

1.5.3.3 Biokemia

Kuusi satunnaisesti kustakin käsittelyä saavasta koeryhmästä ja vehikkeliä saavasta verrokkiryhmästä valittua kanaa sekä kolme kanaa positiivisesta verrokkiryhmästä (silloin kun tätä ryhmää tutkitaan samanaikaisesti) lopetetaan muutaman päivän kuluttua annostelusta ja niiden aivoista ja lannerangasta tehtyjä preparaatteja arvioidaan neuropatian kohde-esteraasin (NTE) estovaikutuksen osalta. Lisäksi voi olla hyödyllistä tehdä preparaatti lonkkahermokudoksesta neuropatian kohde-esteraasin (NTE) estovaikutuksen arvioimiseksi. Yleensä kolme lintua sekä verrokki- että kustakin koeryhmästä lopetetaan 24 tunnin kuluttua ja toiset kolme 48 tunnin kuluttua annostelusta. Positiivisesta kontrolliryhmästä sen sijaan lopetetaan kolme kanaa 24 tunnin kuluttua annostelusta. Jos havainnot myrkytyksen kliinisistä oireista (tämä voidaan usein arvioida havainnoimalla kolinergisten merkkien alkamisajankohtaa) viittaavat toksisen aineen erittäin hitaaseen eliminaatioon, voi olla suositeltavaa ottaa kudosnäyte kolmesta linnusta kahtena eri ajankohtana 24–72 tunnin sisällä annostelusta.

Näille näytteille voidaan tehdä myös asetyylikoliiniesteraasi (AChE)-analyysit, jos se katsotaan tarkoituksenmukaiseksi. AChE voi kuitenkin reaktivoitua spontaanisti *in vivo* ja johtaa aineen voimakkuuden aliarviointiin AChE:n estäjänä.

1.5.3.4 Silmämääräinen ruumiinavaus

Jokaisen eläimen (sekä lopetettavaksi suunniteltujen ja kuolemaisillaan olevien) silmämääräiseen ruumiinavaukseen tulee sisältyä aivojen ja selkäytimen ulkonäön havainnointi.

1.5.3.5 Histopatologinen tutkimus

Havainnointijaksosta hengissä säilyneiden ja biokemiallisissa tutkimuksessa käyttämättömien eläinten hermokudos tutkitaan mikroskooppisesti Kudokset on kiinnitettävä perusfuusiotekniikoilla *in situ.* Sektiot tulee ottaa pikkuaivoista (keskellä kulkeva pitkittäistaso), ydinjatkeesta, selkäytimestä ja ääreishermoista. Selkäydinsektiot tulee ottaa kaularangan yläosasta, rintarangan keskiosasta ja lannerstirangan alueelta. Säärihermon distaalialueelta ja sen kaksoiskantalihasta (m. gastrocnemicus) huoltavista haaroista ja lonkkahermosta otetaan näyte. Sektiot värjätään sopivalla myeliini- ja aksonispesifisillä aineilla.

2. **TULOKSET**

Negatiiviset tulokset tässä menetelmässä valituilla kohdevaikutuksilla (biokemia, histopatologia ja käyttäytymisen havainnointi) eivät normaalisti vaadi viivästyneen neurotoksisuuden lisätestausta. Kohdevaikutuksia koskevat epävarmat tai keskeneräiset tulokset voivat vaatia lisätutkimuksia.

Yksilötiedot on esitettävä. Ne on myös esitettävä yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi eläinten lukumäärä koeryhmittäin testin alussa, leesioita, käyttäytymis- tai biokemiallisia vaikutuksia osoittaneiden eläinten lukumäärä, leesio- tai vaikutustyypit ja niiden vaikeusaste sekä eläinten prosentuaaliset määrät kutakin erityyppistä ja vaikeusasteeltaan erilaisia leesioita tai vaikutusta kohti.

▼B

Tämän tutkimuksen tuloksia tulee arvioida käyttäytymis-, biokemiallisten ja histopatologisten vaikutusten esiintyvyyden, vaikeusasteen ja korrelaation perusteella ja kussakin koe- ja verrokkiryhmässä havaittujen muiden vaikutusten suhteen.

Numeerisia tuloksia tulee arvioida tarkoituksenmukaisin ja yleisesti hyväksytyin tilastollisin menetelmin. Tilastolliset menetelmät tulee valita tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

3. **RAPORTOINTI**

TESTIRAPORTTI

Testiraportin tulee mahdollisuuksien mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet:

— käytetty kanta,

— eläinten lukumäärä ja ikä,

— lähde, elinolosuhteet jne., ja

— kunkin eläimen paino testin alussa.

Koeolosuhteet:

— selostus testiaineen valmistamisesta, säilyvyydestä ja homogeenisuudesta, silloin kun se on tarkoituksenmukaista,

— vehikkelin valintaperusteet,

— selonteko testiaineen annostelusta,

— selonteko ravinnon ja veden laadusta,

— annosvalintojen perustelu,

— annosteltujen annosten erittely, mukaan lukien selonteko vehikkelistä ja annostellun aineen määrästä ja fyysisestä muodosta, ja

— mahdollisen suoja-aineen identifiointi ja selonteko sen annostelusta.

Tulokset:

— ruumiinpaino,

— toksinen vaste annostasoittain, mukaan lukien kuolleisuus,

— kliinisten havaintojen luonne, voimakkuus ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta),

— biokemiallisten menetelmien ja löydösten yksityiskohtainen kuvaus,

— ruumiinavauslöydökset,

— kaikkien histopatologisten löydösten yksityiskohtainen kuvaus, ja

— tulosten tilastollinen käsittely silloin kun se on tarkoituksenmukaista.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

4. **LÄHDELUETTELO**

Tämä menetelmä on analoginen OECD TG 418:n kanssa.

▼B

B.38. **ORGANOFOSFAATTIEN AIHEUTTAMA VIIVÄSTYNYT NEUROTOKSISUUS 28 PÄIVÄN TOISTUVAN ANNOSTELUN TUTKIMUKSESSA**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Aineiden toksisten vaikutusten arvioinnissa on tärkeää ottaa huomioon mahdollisuus, että tietyt aineluokat voivat aiheuttaa erityistä neurotoksisuutta, jota ei ehkä todeta muissa toksisuuskokeissa. Tiettyjen organofosfaattien on havaittu aiheuttavan viivästynyttä neurotoksisuutta, ja niitä tulisi pitää mahdollisina tutkimuskohteina.

Viivästynyttä polyneuropatiaa aiheuttavat aineet voidaan tunnistaa *in vitro* -seulontatesteillä. Negatiiviset tulokset näistä tutkimuksista eivät kuitenkaan todista, ettei testiaine ole neurotoksinen.

Tästä 28 päivää kestävästä viivästynyttä neurotoksisuutta koskevasta kokeesta saadaan tietoa mahdollisista terveyshaitoista, joita toistuvat altistukset rajoitetun aikajakson sisällä todennäköisesti aiheuttavat. Kokeesta saadaan tietoa annosvasteesta ja sen avulla voidaan arvioida haitatonta vaikutustasoa (NOAEL), mistä voi olla hyötyä altistuksen turvallisuusperusteiden määrittelyssä.

Ks. myös yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Organofosfaatteja ovat varauksettomat organofosfaattiesterit, tioesterit tai organofosfori-, organofosfoni- tai organofosforamidihappoanhydridit tai samantyyppisten fosforotioidi-, fosfonotioidi- tai fosforotioamidihappoanhydridit tai muut tässä aineluokassa joskus tavattavat aineet, jotka voivat aiheuttaa viivästynyttä neurotoksisuutta.

Viivästynyt neurotoksisuus on oireyhtymä, johon liittyy ataksian, selkäytimen ja ääreishermon distaalisten aksonopatioiden pitkittynyt viivästynyt ilmeneminen ja neuropatian kohde-esteraasin (NTE) esto ja vanheneminen hermokudoksessa.

1.3 KOEMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta annostellaan kanoille päivittäin suun kautta 28 päivän ajan. Eläimiä havainnoidaan vähintään kerran päivässä käyttäytymispoikkeavuuksien, ataksian ja paralyysin suhteen 14 päivän ajan viimeisestä annoksesta laskettuna. Kustakin ryhmästä satunnaisesti valituille kanoille tehdään biokemialliset määritykset, erityisesti neuropatian kohde-esteraasin (NTE) esto, yleensä 24 ja 48 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta. Kaksi viikkoa viimeisen annoksen jälkeen loput kanat lopetetaan ja valitut hermokudokset tutkitaan histopatologisesti.

▼B

1.4 KOEMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Valmistelut**

Terveet nuoret täysikasvuiset kanat, joilla ei ole häiritseviä virussairauksia, lääkitystä eikä käynnin poikkeavuuksia, jaetaan satunnaisotannalla koe- ja verrokkiryhmiin ja niitä totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen alkua.

Kokeessa käytettävien testihäkkien on oltava tarpeeksi tilavia, jotta kanat voivat liikkua vapaasti ja käynnin havainnointi käy helposti.

Testiainetta annostellaan päivittäin seitsemänä päivänä viikossa mieluiten mahaletkun kautta tai liivatekapseleina. Nesteet voidaan antaa laimentamattomina tai liuotettuna sopivaan vehikkeliin, kuten maissiöljyyn. Kiinteät aineet tulee mahdollisuuksien mukaan liuottaa, koska suuret määrät kiinteää ainetta liivatekapseleissa eivät välttämättä imeydy tehokkaasti. Muiden kuin vesipitoisten vehikkelien toksiset ominaisuudet on oltava tiedossa ja jos ne eivät ole, on ne määritettävä ennen koetta.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Koe-eläimet*

Kokeessa suositellaan käytettäväksi nuoria täysikasvuisia kanoja *(Gallus gallus domesticus),* jotka ovat iältään 8–12 kuukautta. Kanojen tulee olla normaalikokoisia, -lajisia ja -kantaisia ja mieluiten kasvatettu oloissa, joissa ne ovat voineet liikkua vapaasti.

1.4.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Kokeessa tulee yleensä käyttää vähintään kolmea koeryhmää ja yhtä vehikkeliä saavaa verrokkiryhmää. Vehikkeliä saavaa verrokkiryhmää tulee käsitellä täsmälleen samoin kuin koeryhmää lukuun ottamatta testiaineen annostelua.

Kussakin ryhmässä tulee olla riittävä määrä lintuja, jotta vähintään kuusi lintua voidaan lopettaa biokemiallisia määrityksiä varten (kolme kanaa kahtena eri ajankohtana) ja kuusi lintua säilyy hengissä 14 päivän havaintojakson ajan patologiaa varten.

1.4.2.3 *Annostasot*

Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon viivästynyttä neurotoksisuutta koskevan akuutin testin tulokset ja kaikki muut testiyhdisteestä saatavilla olevat toksisuus- tai kinetiikkatiedot. Korkein annostaso tulee valita siten, että se aiheuttaa toksisia vaikutuksia, mieluiten viivästynyttä neurotoksisuutta, mutta ei kuolemaa eikä ilmeistä kärsimystä. Tämän jälkeen annostasot valitaan asteittain alenevasti mahdollisen annosvasteen ja haitattoman vaikutustason (NOAEL) osoittamiseksi alhaisimmalla annostasolla.

▼B

1.4.2.4 *Raja-annoskoe*

Jos kokeessa ei vähintään 1 000 mg/kg/vrk:n annostasolla tässä tutkimuksessa kuvatuilla toimenpiteillä todeta havaittavia toksisia vaikutuksia ja jos toksisuutta ei ole odotettavissa rakenteellisesti samantyyppisistä aineista olevien tietojen perusteella, tutkimusta suuremmalla annoksella ei pidetä tarpeellisena. Raja-annoskoe voidaan tehdä paitsi silloin kun odotettavissa oleva altistus ihmisellä viittaa tarpeeseen käyttää korkeampaa annostasoa.

1.4.2.5 *Havainnointijakso*

Kaikkia eläimiä tulee havainnoida vähintään kerran päivässä altistusaikana ja 14 päivän ajan sen jälkeen, lukuun ottamatta eläimiä, joille aiotaan tehdä ruumiinavaus.

1.4.3 **Kokeen suorittaminen**

Eläimille annetaan testiainetta seitsemänä päivänä viikossa 28 päivän ajan.

1.4.3.1 *Yleishavainnot*

Havainnoinnin tulee alkaa heti käsittelyn alettua. Kaikkia kanoja tulee havainnoida tarkoin vähintään kerran päivässä kunakin 28 käsittelypäivänä ja 14 päivän ajan annostelun päätyttyä tai siihen asti kunnes eläin aiotaan lopettaa. Kaikki toksisuusoireet tulee kirjata muistiin, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, tyyppi, voimakkuus ja kesto. Havaintoihin tulee sisältyä muun muassa käyttäytymispoikkeavuudet. Ataksia tulee mitata vähintään neliportaisella ordinaaliasteikolla ja paralyysi tulee kirjata muistiin. Kanat on päästettävä häkistä vähintään kahdesti viikossa ja pakotettava joksikin aikaa liikkumaan, kuten kiipeämään tikkaita, vähäisten toksisten vaikutusten havainnoinnin helpottamiseksi. Kuolemaisillaan olevat ja voimakasta kärsimystä tai kipua osoittavat eläimet tulee poistaa heti kun niiden tila huomataan ja lopettaa humaanilla tavalla ja niille tulee tehdä ruumiinavaus.

1.4.3.2 *Ruumiinpaino*

Kaikki kanat on punnittava juuri ennen testiaineen ensimmäistä annostelua ja vähintään kerran viikossa sen jälkeen.

1.4.3.3 *Biokemia*

Kuusi satunnaisesti kustakin käsittelyä saavasta koeryhmästä ja vehikkeliä saavasta verrokkiryhmästä valittua kanaa lopetetaan muutaman päivän kuluttua viimeisen annoksen antamisesta ja niiden aivoista ja lannerangasta tehtyjä preparaatteja arvioidaan neuropatian kohde-esteraasin (NTE) estovaikutuksen osalta. Lisäksi voi olla hyödyllistä tehdä preparaatti lonkkahermokudoksesta neuropatian kohde-esteraasin (NTE) estovaikutuksen arvioimiseksi. Tavallisesti kolme lintua sekä verrokki- että kustakin koeryhmästä lopetetaan 24 tunnin kuluttua ja toiset kolme 48 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta laskettuna. Jos tiedot akuutista tutkimuksesta tai muista tutkimuksista (esim. toksikokinetiikka) viittaavat siihen, että eläimet tulisi mieluiten lopettaa joinakin muina ajankohtina viimeisen annostelun jälkeen, tulisi näitä aikoja noudattaa ja perustelut dokumentoida.

Näille näytteille voidaan tehdä myös asetyylikoliiniesteraasi (AChE)-analyysit, jos se katsotaan tarkoituksenmukaiseksi. AChE voi kuitenkin reaktivoitua spontaanisti *in vivo* ja johtaa aineen voimakkuuden aliarviointiin AChE:n estäjänä.

▼B

1.4.3.4 *Silmämääräinen ruumiinavaus*

Jokaisen eläimen (sekä lopetettavaksi suunniteltujen ja kuolemaisillaan olevien) silmämääräiseen ruumiinavaukseen tulee sisältyä aivojen ja selkäytimen ulkonäön havainnointi.

1.4.3.5 *Histopatologinen tutkimus*

Havainnointijaksosta hengissä säilyneiden ja biokemiallisissa tutkimuksessa käyttämättömien eläinten hermokudos tutkitaan mikroskooppisesti. Kudokset on kiinnitettävä perfuusiotekniikoilla *in situ.* Sektiot tulee ottaa pikkuaivoista (keskellä kulkeva pitkittäistaso), ydinjatkeesta, selkäytimestä ja ääreishermoista. Selkäydinsektiot tulee ottaa kaularangan yläosasta, rintarangan keskiosasta ja lanneristirangan alueelta. Säärihermon distaalialueelta ja sen kaksoiskantalihasta (m. gastrocnemicus) huoltavista haaroista ja lonkkahermosta otetaan näyte. Sektiot värjätään sopivilla myeliini- ja aksonispesifisillä aineilla. Ensin tehdään mikroskooppitutkimukset verrokki- ja suuriannoksisen ryhmän eläinten säilytetyille kudoksille. Kun vaikutuksista suuriannoksisessa ryhmässä on näyttöä, tehdään mikroskooppitutkimukset myös keskisuurten ja pienen annoksen ryhmissä.

2. **TULOKSET**

Negatiiviset tulokset tässä menetelmässä valituilla kohdevaikutuksilla (biokemia, histopatologia ja käyttäytymisen havainnointi) eivät normaalisti vaadi viivästyneen neurotoksisuuden lisätestausta. Kohdevaikutuksia koskevat epävarmat tai keskeneräiset tulokset voivat vaatia lisätutkimuksia.

Yksilötiedot on esitettävä. Ne on myös esitettävä yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi eläinten lukumäärä koeryhmittäin testin alussa, leesioita, käyttäytymis- tai biokemiallisia vaikutuksia osoittaneiden eläinten lukumäärä, leesio- tai vaikutustyypit ja niiden vaikeusaste sekä eläinten prosentuaaliset määrät kutakin erityyppistä ja vaikeusasteeltaan erilaista leesiota tai vaikutusta kohti.

Tämän tutkimuksen tuloksia tulee arvioida käyttäytymis-, biokemiallisten ja histopatologisten vaikutusten esiintyvyyden, vaikeusasteen ja korrelaation perusteella ja kussakin koe- ja verrokkiryhmässä havaittujen muiden vaikutusten suhteen.

Numeerisia tuloksia tulee arvioida tarkoituksenmukaisin ja yleisesti hyväksytyin tilastollisin menetelmin. Tilastolliset menetelmät tulee valita tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

3. **RAPORTOINTI**

TESTIRAPORTTI

Testiraportin tulee mahdollisuuksien mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet:

— käytetty kanta,

— eläinten lukumäärä ja ikä,

— lähde, elinolosuhteet jne., ja

— kunkin eläimen paino testin alussa.

▼B

Koeolosuhteet:

— selostus testiaineen valmistamisesta, säilyvyydestä ja homogeenisuudesta, silloin kuin se on tarkoituksenmukaista,

— vehikkelin valintaperusteet,

— selonteko testiaineen annostelusta,

— selonteko ravinnon ja veden laadusta,

— annosvalintojen perustelut,

— annosteltujen annosten erittely, mukaan lukien selonteko vehikkelistä ja annostellun aineen määrästä ja fyysisestä muodosta, ja

— perustelut biokemiallisten määritysten ajankohtien muuttamisesta muuksi kuin 24 ja 48 tuntia viimeisestä annostelusta.

Tulokset:

— ruumiinpaino,

— toksinen vaste annostasoittain, mukaan lukien kuolleisuus,

— haitaton vaikutustaso (NOAEL),

— kliinisten havaintojen luonne, voimakkuus ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta),

— biokemiallisten menetelmien ja löydösten yksityiskohtainen kuvaus,

— ruumiinavauslöydökset,

— kaikkien histopatologisten löydösten yksityiskohtainen kuvaus, ja

— tulosten tilastollinen käsittely silloin kun se on tarkoituksenmukaista.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

4. **LÄHDELUETTELO**

Tämä menetelmä on analoginen OECD RG 419:n kanssa.

▼B

B.39. **UDS-TESTI NISÄKKÄIDEN MAKSASOLUILLA *IN VIVO***

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkkäiden maksasoluilla *in vivo* tehtävän UDS-testin (unscheduled DNA Synthesis (UDS) test) tarkoituksena on tunnistaa tutkittavat aineet, jotka aiheuttavat DNA:n korjautumista altistettujen eläinten maksasoluissa (1) (2) (3) (4).

Tällä in *vivo* -testillä voidaan tutkia kemiallisten aineiden genotoksisia vaikutuksia maksassa. Mitattava tulostapahtuma ilmaisee DNA-vaurion ja sen myöhemmän korjautumisen maksasoluissa. Elimistöön imeytyvät kemialliset aineet metaboloituvat yleensä pääasiassa maksassa. Se soveltuu siten hyvin DNA-vaurioiden mittaamiseen *in vivo.*

Jos on saatu viitteitä siitä, että tutkittava aine ei pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Lopputapahtuma, S-vaiheen ulkopuolinen DNA-synteesi (unscheduled DNA-synthesis), mitataan määrittämällä radioaktiivisesti merkittyjen nukleosidien inkorporoitumista DNA:han solunjakautumissyklin S-vaiheen ulkopuolella. Yleisimmin käytetty menetelmä on tritiumilla merkityn tymidiinin (^{3}H-TdR) inkorporoitumisen määrittäminen autoradiografisesti. *In vivo* UDS-testeissä käytetään pääasiassa rotan maksaa. Myös muita kudoksia kuin maksaa voidaan käyttää, mutta niitä ei kuvata tämän menetelmän yhteydessä.

UDS-vasteen toteaminen riippuu irtileikkautuneiden ja korvautuneiden DNA-segmenttien lukumäärästä vauriokohdassa. UDS-testi on sen vuoksi erityisen arvokas kemiallisten aineiden aiheuttamien ”pitkien DNA-pätkien korjautumisten” (”longpatch repair”) (20–30 emästä) toteamisessa. Testin herkkyys on sen sijaan huomattavasti heikompi ”lyhyiden pätkien korjautumisen” (”shortpatch repair”) (1–3 emästä) toteamisessa. Mutageenisia muutoksia saattaa lisäksi syntyä DNA-vaurioiden korjautumattomuuden, korjautumisvirheiden tai kahdentumisvirheiden seurauksena. UDS-vasteen laajuus ei anna viitteitä korjausprosessien luotettavuudesta. On myös mahdollista, että mutageeni reagoi DNA:n kanssa mutta DNA-vaurio ei korjaudu leikkautumiskorjautumisprosessin kautta. Koska tämä lopputapahtuma mitataan koko genomista, sen potentiaalinen herkkyys kompensoi sitä, ettei UDS-testi tuota spesifistä tietoa tutkittavan aineen mutageenisesta aktiivisuudesta.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Korjautuvat solut: jyvästen nettomäärä tumissa eli NNG-arvo on suurempi kuin etukäteen asetettu arvo, joka on määriteltävä testin suorittavassa laboratoriossa.

NNG-arvo (net nuclear grains): solujen UDS-aktiivisuuden kvantitatiivinen mitta autoradiografialla tehdyissä UDS-testeissä laskettuna siten, että sytoplasmisten jyvästen keskimääräinen lukumäärä tumaa vastaavilla sytoplasma-alueilla (CG) vähennetään tumissa havaittavien jyvästen (NG) lukumäärästä (NG): NNG = NG — CG. NNG-määrät lasketaan yksittäisistä soluista, minkä jälkeen luvut yhdistetään saman viljelmän solujen osalta, rinnakkaisviljelmien solujen osalta jne.

▼B

UDS (Unscheduled DNA Synthesis): DNA:n korjautumissynteesi sen jälkeen, kun kemiallisten aineiden tai fysikaalisten tekijöiden aiheuttaman vaurion alueen sisältävä DNA-jakso on leikkautunut irti ja poistunut kromosomista.

1.3 TESTIN PERIAATE

UDS-testi nisäkkään maksasoluilla *in vivo* osoittaa DNA korjautumissynteesin sen jälkeen, kun kemiallisten aineiden tai fysikaalisten tekijöiden aiheuttaman vaurion alueen sisältävä DNA-jakso on leikkautunut irti ja poistunut kromosomista. Testi perustuu yleensä ^{3}H-TdR:n inkorporoitumiseen solujen DNA:han maksassa, jossa on yleensä vain vähän solusyklin S-vaiheessa olevia soluja. ^{3}H-TdR:n inkorporoituminen määritetään yleensä autoradiografisesti, sillä tämä tekniikka ei ole herkkä S-vaiheessa oleville soluille kuten esimerkiksi nestetuikelaskenta.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelut**

1.4.1.1 *Eläinlajin valinta*

Yleisesti käytetty eläinlaji on rotta, mutta myös muita soveltuvia nisäkäslajeja voidaan käyttää. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään ± 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta.

1.4.1.2 *Asuinolot ja ruokinta*

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B yleisjohdannossa mainitut, mutta kosteustavoitteen on oltava 50–60 %.

1.4.1.3 *Eläinten valmistelu*

Terveet nuoret täysikasvuiset eläimet jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti ja pidetään häkeissään vähintään viisi päivää ennen tutkimuksen aloittamista, jotta ne ehtivät sopeutua laboratorio-olosuhteisiin.

1.4.1.4 *Tutkittava aine / valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli se on mahdollista.

▼B

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen itsenäisesti suoritettavaan testin osaan on otettava mukaan rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrolliaineiden on oltava aineita, joiden tiedetään aiheuttavan UDS-reaktion, kun niitä annetaan pitoisuuksina, joiden odotetaan aiheuttavan havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna. Metabolista aktivaatiota vaativia positiivisia kontrolliaineita on käytettävä annoksina, jotka aiheuttavat kohtalaisen vasteen (4). Annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät heti paljasta lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Näytteidenottoajat	Aine	CAS-nro	EINECS-nro
Varhaiset näytteidenottoajat (2–4 tuntia)	N-nitrosodimetyyliamiini	62-75-9	200-249-8
Myöhäiset näytteidenottoajat (12–16 tuntia)	N-2-fluorenyyliasetamidi (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Myös muita sopivia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää. Positiiviset kontrolliaineet voidaan antaa myös muuta reittiä pitkin kuin testattava aine.

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Koe-eläinten määrän on oltava riittävä testivasteen luonnollinen biologinen vaihtelu huomioon ottaen. Analysoitavissa olevia eläimiä on oltava vähintään kolme ryhmää kohti. Mikäli merkittävä tietokanta on kerätty jo aikaisemmin, rinnakkaisiin negatiivisiin ja positiivisiin kontrolliryhmiin tarvitaan vain yksi tai kaksi eläintä.

Vain toista sukupuolta, mieluiten uroksia, voidaan käyttää, mikäli tutkimusajankohtana on käytettävissä samalla eläinlajilla ja samalla altistustavalla tehtyjä tutkimuksia, joiden tulokset osoittavat, ettei myrkkyvaikutuksessa ole huomattavia eroja sukupuolten välillä. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemialliselle aineelle voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Tutkittavia aineita annetaan yleensä yhtenä altistuksena.

1.5.3 **Annostasot**

Normaalisti käytetään vähintään kahta annostasoa. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisyysoireita, että samalla annosteluohjelmalla suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan. Pienemmän annoksen pitäisi yleensä olla 50–25 % suuresta annoksesta.

▼B

Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit), saattavat edellyttää muita annoksenmäärityskriteerejä, ja ne pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa annosteluohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää.

Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkyllisyyteen viittaavia muutoksia maksassa (esim. pyknoottisia tumia).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2 000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivän aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus ei ehkä ole välttämätön. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostasojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Vatsaontelonsisäistä annostelua ei kuitenkaan suositella, koska maksa saattaisi tällöin altistua tutkittavalle aineelle suoraan eikä verenkierron kautta. Koc-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

1.5.6 **Maksasolujen preparointi**

Maksasolut preparoidaan tutkittavalle aineelle altistetuista eläimistä yleensä 12–16 tunnin kuluttua annostelusta. Ylimääräinen varhaisempi näytteenottoajankohta (yleensä 2–4 tunnin kuluttua altistuksesta) on yleensä tarpeen, ellei selvää positiivista vastetta havaita 12–16 tunnin kuluttua. Myös muut näytteidenottoajankohdat ovat kuitenkin mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella toksikokineettisten tutkimustulosten perusteella.

Lyhytaikaisviljelmät nisäkkäiden maksasoluista perustetaan yleensä siten, että maksaa perfusoidaan kollagenaasilla *in situ* ja tuoreiden irronneiden maksasolujen annetaan kiinnittyä sopivaan pintaan. Negatiivisista kontrollieläimistä kerättyjen maksasolujen elinkykyisyyden (5) pitäisi olla vähintään 50 prosenttia.

1.5.7 **UDS:n määrittäminen**

Hiljattain eristettyjä nisäkkäiden maksasoluja inkuboidaan yleensä ^{3}H-TdR:ää sisältävässä kasvatusväliaineessa sopivan pituinen aika, esim. 3–8 tuntia. Inkubaatioajan päätyttyä kasvatusväliaine erotetaan soluista, minkä jälkeen soluja voidaan inkuboida kasvatusväliaineessa, joka sisältää ylimääräistä merkitsemätöntä tymidiiniä inkorporoitumattoman radioaktiivisuuden vähentämiseksi. Tämän jälkeen solut huuhdellaan, fiksoidaan ja kuivataan. Pitempiä inkubaatioaikoja käytettäessä käsittely merkitsemättömällä tymidiinillä ei ehkä ole tarpeen. Objektilasit kastetaan autoradiografiemulsioon, valotetaan pimeässä (esim. säilytetään jääkaapissa 7–14 päivää), kehitetään, värjätään ja lasketaan valottuneet hopeajyväset. Jokaisesta eläimestä valmistetaan 2–3 objektilasia.

▼B

1.5.8 **Analyysi**

Objektilasipreparaattien tulisi sisältää riittävästi soluja, joiden morfologia on normaali, jotta luotettava UDS-analyysi voidaan tehdä. Preparaateista tehdään mikroskooppitutkimus selvän sytotoksisuuden merkkien havaitsemiseksi (esim. pyknoosi, radioaktiivisuuden väheneminen).

Objektilasit on koodattava ennen jyvästen laskemista. Normaalisti jokaisesta eläimestä lasketaan 100 solua vähintään kahdesta objektilasista; jos lasketaan alle 100 solua/eläin, tämä on perusteltava. Jyvästen määrää ei lasketa S-vaiheessa olevista tumista, mutta S-vaiheessa olevien solujen suhteellinen osuus voidaan rekisteröidä.

Morfologisesti normaalien solujen tumaan ja sytoplasmaan inkorporoituneen ^{3}H-TdR:n määrä, joka näkyy hopeajyvästen kertymänä, on määritettävä soveltuvilla menetelmillä.

Hopeajyvästen määrä määritetään tumien kohdalta (tumassa esiintyvät jyväset, NG) ja tumaa vastaavilta alueilta sytoplasman kohdalta (sytoplasmiset jyväset, CG). CG-määrät mitataan joko valitsemalla sytoplasmasta kaikkein eniten radioaktiivisesti merkittyä ainetta sisältävä alue tai valitsemalla keskimäärin kaksi tai kolme satunnaisesti valittua tuman vierestä laskettua sytoplasmisten jyvästen määrää. Myös muita laskentamenetelmiä (esim. kokosolulaskentaa) voidaan käyttää, jos ne voidaan perustella (6).

2. **TULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Jokaisen objektilasin ja jokaisen eläimen tiedot on esitettävä erikseen. Lisäksi kaikkien tietojen yhteenveto on esitettävä taulukkomuodossa. Tumassa esiintyvien jyvästen nettomäärät (NNG) on laskettava jokaisesta solusta, jokaisesta eläimestä ja jokaisesta annoksesta ja ajankohdasta erikseen vähentämällä CG-lukemat NG-lukemista. Jos ”korjautuvat solut” lasketaan, käsitteen ”korjautuvat solut” kriteerit on perusteltava ja niiden on perustuttava negatiivisista kontrolleista aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saatuihin tietoihin. Numeeriset tulokset voidaan arvioida tilastollisin menetelmin. Jos tilastollisia testejä käytetään, ne on valittava ja perusteltava ennen tutkimusta.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Esimerkkejä positiivisten/negatiivisten vasteiden kriteereistä:

positiivinen
- i) NNG-arvot ovat aikaisemmin asetettujen, laboratoriokohtaisiin vertailuarvoihin perustuvien kynnysarvojen yläpuolella; tai
- ii) NNG-arvot ovat merkitsevästi suurempia kuin rinnakkaisessa kontrollissa;

negatiivinen
- i) NNG-arvot ovat laboratoriokohtaisiin vertailuarvoihin perustuvan kynnysarvon tasalla tai sen alapuolella; tai
- ii) NNG-arvot eivät ole merkitsevästi suuremmat kuin rinnakkaisessa kontrollissa.

▼B

Tulosten biologista merkitystä on pohdittava: huomioitavia parametreja ovat eläinten väliset erot, annos-vastesuhde ja sytotoksisuus. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa. Tilastollinen merkitsevyys ei saa kuitenkaan olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tulosten pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen määrästä riippumatta.

Nisäkkäiden maksasoluissa *in vivo* tehdyssä UDS-testissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa nisäkkäiden maksasoluissa *in vivo* DNA-vaurioita, jotka S-vaiheen ulkopuolinen DNA-synteesi (unscheduled DNA synthesis) voi korjata *in vitro*. Negatiivinen tulos osoittaa, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa sellaisia DNA-vaurioita, jotka voidaan todeta tällä testillä.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä yleiseen verenkiertoon tai erityisesti kohdekudokseen on pohdittava.

3. **RAPORTOINTI**

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.,

— eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

Koeolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollit,

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset,

— annostasojen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen valmistelun yksityiskohdat,

— tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat,

— antotavan valintaperusteet,

— menetelmät, joilla on vahvistettu tutkittavan aineen pääsy yleiseen verenkiertoon tai kohdekudokseen tarvittaessa,

▼B

— ravintoon/juomaveteen sekoitetun testattavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk) tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta,

— yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteidenotto-ohjelmasta,

— myrkkyvaikutuksen mittausmenetelmät,

— maksasolujen preparointi- ja viljelymenetelmä,

— käytetty autoradiografinen tekniikka,

— preparoitujen objektilasien lukumäärä ja laskettujen solujen lukumäärät,

— arviointikriteerit,

— kriteerit, joiden perusteella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— tumassa esiintyvien jyvästen määrien, sytoplasmisten jyvästen määrien ja tumassa esiintyvien jyvästen nettomäärien keskiarvot yksittäistä objektilasia, eläintä ja ryhmää kohti,

— mahdollinen annos-vastesuhde,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— rinnakkaisten negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisten kontrollien tulokset,

— aikaisemmat negatiivisilla (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisilla kontrolleilla saadut tutkimustulokset sekä vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat,

— ”korjautuvien solujen” lukumäärä, jos määritetty,

— S-vaiheessa olevien solujen lukumäärä, jos määritetty,

— solujen elinkykyisyys.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUTTA**

(1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.,* 156, s. 1–18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.,* 189, s. 123–133.

(3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993), *In Vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland, D. J. and Fox, M., (eds) *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommitte on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 52–77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo. Mutation Res.,* 312, s. 263–285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.,* 291, s. 21–27.

(6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, s. 553–562.

▼B

B.40. *IN VITRO* IHOSYÖVYTTÄVYYS: IHON SÄHKÖVASTUSMÄÄRITYSTESTI (TER)

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro TG 430 (2004)

1.1. JOHDANTO

Ihosyövyttävyydellä tarkoitetaan palautumattoman kudosvaurion ilmenemistä ihossa testiaineen aplikaation jälkeen [määritelmä sisältyy GHS-järjestelmään (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures)] (1). Seuraavassa kuvatulla testimenetelmällä voidaan arvioida syövyttävyys tarvitsematta käyttää eläviä koe-eläimiä.

Ihosyövyttävyyden arviointi on tyypillisesti edellyttänyt koe-eläinten käyttöä (2). Huoli testissä käytettäville eläimille aiheutuvasta kärsimyksestä on otettu huomioon testimenetelmän B.4 tarkistetussa versiossa, jossa ihosyövyttävyys voidaan määrittää käyttämällä vaihtoehtoisia *in vitro* -menetelmiä, joissa eläimille ei aiheuteta kipua tai kärsimystä.

Sääntelytarkoituksiin käytettävien vaihtoehtoisten ihosyövyttävyystestien kehittäminen aloitettiin validointia edeltävillä tutkimuksilla (3). Tämän jälkeen tehtiin ihosyövyttävyyden arviointiin *käytettävien in vitro* -menetelmien (4) (5) virallinen validointitutkimus (6) (7) (8). Näiden tutkimusten tulokset ja muu julkaistu kirjallisuus johtivat siihen suositukseen, että ihosyövyttävyyden arviointiin *in vivo* voitaisiin käyttää seuraavia testejä (9) (10) (11): ihmisihomallitesti (testimenetelmä B.40 a) ja sähkövastusmääritystesti (tässä kuvattu menetelmä).

Validointitutkimus ja muut julkaistut tutkimukset osoittivat, että rotan ihon sähkövastusmäärityksellä (TER) (12) (13) voidaan luotettavasti erottaa tunnetut ihoa syövyttävät kemikaalit sellaisista kemikaaleista, jotka eivät syövytä ihoa (5) (9).

Tässä kuvatulla testimenetelmällä voidaan tunnistaa syövyttävät kemialliset aineet ja seokset. Sillä voidaan tunnistaa myös sellaiset aineet ja seokset, jotka eivät syövytä ihoa, kunhan tukena on muista käytettävissä olevista tiedoista saatua näyttöä (esim. pH, rakenneaktiivisuussuhteet, koehenkilöillä ja/tai -eläimillä tehdyistä kokeista saadut tiedot) (1) (2) (11) (14). Se ei tarjoa tietoa ihoärsytyksestä, eikä sen perusteella ole mahdollista luokitella syövyttäviä aineita GHS-järjestelmän (Globally Harmonised Classification System) mukaisiin alaluokkiin (1).

Haluttaessa arvioida kattavasti ihoaltistuksen jälkeiset paikalliset ihovaikutukset suositellaan käytettäväksi testimenetelmän B.4 liitteessä esitettyä monivaiheista testausta (2), joka on esitetty GHS-järjestelmässä (1). Kyseiseen testaukseen kuuluu ihosyövyttävyystestien (tässä kuvattu testimenetelmä) ja ihoärsytystestien suorittaminen *in vitro* ennen testauksen harkitsemista elävillä eläimillä.

▼B

1.2. MÄÄRITELMÄT

Ihosyövyttävyys *in vivo:* korjautumattoman ihovaurion eli orvaskeden läpi verinahkaan ulottuvan näkyvän kuolion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testiaineen annostelun jälkeen. Tyypillisiä syöpymisreaktioita ovat haavaumat, verenvuoto, veriset ruvet sekä 14 päivän tarkkailujakson lopussa ihon vaalenemisen aiheuttama värinmuutos, kokonaan kaljuuntuneet alueet ja arvet. Epäselvien vaurioiden tapauksessa olisi harkittava histopatologista tutkimusta.

Ihon sähkövastus (TER) on ihon sähköisen impedanssin mittayksikkö (kilo-ohmeina). Kyseessä on ihon suojaavan vaikutuksen arviointiin käytettävä yksinkertainen ja luotettava menetelmä, jossa rekisteröidään ihon läpi kulkevat ionit Wheatstone-siltamittauksella.

1.3. VERTAILUAINEET

Taulukko 1

Vertailukemikaalit

Nimi	EINECS-numero	CAS-numero	
1,2-Diaminopropaani	201-155-9	78-90-0	Erittäin syövyttävä
Akryylihappo	201-177-9	79-10-7	Erittäin syövyttävä
2-tert-Butyylifenoli	201-807-2	88-18-6	Syövyttävä
Kaliumhydroksidi (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Syövyttävä
Rikkihappo (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Syövyttävä
Oktaanihappo (kapryylihappo)	204-677-5	124-07-02	Syövyttävä
4-Amino-1,2,4-triatsoli	209-533-5	584-13-4	Ei syövyttävä
Eugenoli	202-589-1	97-53-0	Ei syövyttävä
Fenetyylibromidi	203-130-8	103-63-9	Ei syövyttävä
Tetrakloorietyleeni	204-825-9	27-18-4	Ei syövyttävä
Isosteariinihappo	250-178-0	30399-84-9	Ei syövyttävä
4-(Metyylitio)-bentsaldehydi	222-365-7	3446-89-7	Ei syövyttävä

Useimmat taulukossa mainituista kemikaaleista on valittu ECVAM:in kansainvälisessä validointitutkimuksessa käytettyjen kemikaalien joukosta (4). Ne valittiin seuraavilla perusteilla:

i) Syövyttäviä ja ei-syövyttäviä aineita on oltava yhtä paljon.

▼B

ii) Niiden on oltava kaupallisesti saatavilla olevia aineita, jotka kattavat useimmat relevantit kemikaaliluokat.

iii) Mukana on oltava sekä erittäin syövyttäviä että vähemmän syövyttäviä aineita, jotta mahdollistettaisiin syövyttävyysvoimakkuuden mukainen luokittelu.

iv) Kemikaaleja on voitava käsitellä laboratoriossa aiheuttamatta vakavia riskejä (syövyttävyyttä lukuun ottamatta).

1.4. TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta aplikoidaan enintään 24 tunnin ajan ihonäytteiden orvaskesipinnalle kaksikammioisessa testijärjestelmässä, jossa ihonäytelevyt toimivat kammioiden välisenä erotusseinänä. Ihonäytteet otetaan inhimillisellä tavalla lopetetuista 28–30 päivän ikäisistä rotista. Aineen katsotaan olevan syövyttävä, jos marraskesi tulee läpäiseväksi, mikä mitataan ihon sähkövastuksen pienenemisenä tietyn raja-arvon alapuolelle (12). Rotan ihon sähkövastuksen raja-arvoksi valittiin 5 kΩ. Valinta perustui laajoihin tietoihin useista kemikaaleista, joiden osalta arvot olivat (valtaenemmistössä) selvästi yli kyseisen arvon (usein > 10 kΩ) tai ali sen (usein < 3 kΩ). Yleensä materiaalit, jotka eivät ole syövyttäviä eläimissä (mutta voivat olla joko ärsyttäviä tai ei-ärsyttäviä), eivät laske ihon sähkövastusta alle kyseisen erottavan arvon. Lisäksi muiden ihonäytteiden tai muiden laitteiden käyttö voi muuttaa raja-arvoa, mikä edellyttää lisävalidointia.

Testimenetelmään lisätään väriaineensitomisvaihe, jotta voidaan vahvistaa positiiviset tulokset tapauksissa, joissa arvo on lähellä 5 kΩ:ia. Väriaineensitomisvaiheessa voidaan määrittää, johtuuko ionien läpäisykyvyn lisääntyminen marraskeden rakenteen tuhoutumisesta. Rotan ihoa käyttävän menetelmän on osoitettu kykenevän ennustamaan syövyttävyyttä *in vivo* kanissa, jota käytettiin koe-eläimenä testimenetelmän B.4 mukaisessa testissä (2). On huomattava, että *in vivo* -kanitesti on karkea ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen suhteen verrattuna ihmisiholla suoritettavaan lapputestiin (15).

1.5. TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1. **Eläimet**

Testiä varten valittu laji on rotta, koska rottien ihon herkkyys testattaville kemikaaleille on osoitettu aikaisemmissa tutkimuksissa (10). Rotan iällä (jossa ihonäyte otetaan) ja kannalla on erityinen merkitys, sillä testi edellyttää, että rottien karvatupet ovat vielä uinuvassa tilassa ennen aikuisen yksilön karvankasvun alkua.

▼B

Nuorten (noin 22 päivän ikäisten) uros- tai naarasrottien (Wistar tai vastaava kanta) selästä ja kyljistä ajetaan karvat tarkasti pienillä karvaleikkureilla. Eläimet pestään pyyhkimällä huolellisesti, ja aluetta, jolta on poistettu karvat, käsitellään runsaalla määrällä antibioottiliuosta (jossa on bakteerikasvua tehokkaasti estävät pitoisuudet esim. streptomysiiniä, penisilliiniä, kloramfenikolia ja amfoterisiiniä). Eläimet pestään jälleen antibioottiliuoksella kolmantena tai neljäntenä päivänä ensimmäisen pesun jälkeen ja käytetään kokeisiin kolmen päivän sisällä toisesta pesusta, kun marraskesi on toipunut karvojen poistosta.

1.5.2. **Ihonäytteiden valmistus**

Eläimet lopetetaan inhimillisesti 28–30 päivän ikäisinä; ikävaatimus on ehdoton. Kunkin eläimen selkä- ja kylkinahka poistetaan ja nahasta kuoritaan tarkasti ylimääräinen ihonalainen rasva. Ihosta otetaan läpimitaltaan noin 20 mm:n suuruiset näytteet. Ihonäytteet voidaan varastoida ennen niiden käyttöä, jos voidaan osoittaa, että positiivisilla ja negatiivisilla kontrolleilla saatavat tiedot vastaavat tuoreilla näytteillä saatuja.

Kukin ihonäyte asetetaan polytetrafluoroetyleeniputken (PTFE-putken) toisen pään yli siten, että orvaskesipinta on kosketuksissa putken kanssa. Ihonäyte kiristetään paikalleen kumisella O-renkaalla, ja liika nahka leikataan pois. Kuvassa 2 esitetään putken ja O-renkaan mitat. O-rengas tiivistetään huolellisesti PTFE-putken päähän vaseliinilla. Putki kiinnitetään jousipidikkeellä koeastian sisälle, jossa on $MgSO_4$-liuosta (154 mM) (kuva 1). Ihonäyte on kokonaan upotettava $MgSO_4$-liuokseen. Yhdestä rotan nahasta on mahdollista saada 10–15 ihonäytettä.

Ennen testauksen alkua mitataan kahden ihonäytteen sähkövastus kunkin eläimen nahan laadunvarmistusmenettelynä. Kummankin näytteen vastusarvon on oltava yli 10 kΩ, jotta muita nahasta saatuja ihonäytteitä voidaan käyttää testissä. Jos vastusarvo on alle 10 kΩ, kaikki samasta nahasta saadut näytteet on hylättävä.

1.5.3. **Testi-ja kontrolliaineen aplikoiminen**

Kussakin testissä on käytettävä samaan aikaan tehtyjä positiivisia ja negatiivisia kontrollimäärityksiä, jotta voidaan varmistaa testimallin riittävä suorituskyky. Testissä käytetään vain yhdestä eläimestä otettuja ihonäytteitä. Suositellut kontrolliaineet ovat 10 M suolahappo (positiivinen kontrolli) ja tislattu vesi (negatiivinen kontrolli).

Nestemäiset testiaineet (150 µl) aplikoidaan tasaisesti putken sisäpuolella olevalle orvaskesipinnalle. Kun testataan kiinteitä aineita, ainetta on pantava tasaisesti näytepalan päälle riittävä määrä, että se peittää koko orvaskesipinnan. Kiinteän aineen päälle lisätään sitten deionisoitua vettä (150 µl) ja putkea ravistellaan varovasti. Jotta kiinteä testiaine olisi mahdollisimman hyvin kosketuksissa ihon kanssa, ainetta voidaan sulattaa tai pehmentää lämmittämällä se 30 °C:een tai se voidaan jauhaa rakeiseksi tai pulverimaiseksi.

▼B

Kutakin testi-ja kontrolliainetta varten käytetään kolme ihonäytettä. Testiaineita aplikoidaan 24 tunnin ajaksi lämpötilassa 20–23 ºC. Testiaine poistetaan pesemällä vesihanan alla enintään 30 ºC:n lämpötilassa, kunnes ainetta ei enää irtoa.

1.5.4. **Ihon sähkövastuksen mittaukset**

Ihon impedanssi mitataan ihon sähkövastuksena matalajännitevaihtovirtasillalla (Wheatstone-silta) (13). Sillan yleiset eritelmät ovat: käyttöjännite 1–3 volttia, vaihtovirta 50–1 000 Hz (sini- tai suorakaideaalto) ja mittausalue vähintään 0,1-30 k*Ω*. Validointitutkimuksessa käytetty silta mittasi induktanssin aina arvoon 2 000 H, kapasitanssin arvoon 2 000 µF ja vastuksen arvoon 2 M*Ω* taajuuksilla 100 Hz tai 1 kHz sarja-arvoina tai rinnakkaisina arvoina. Ihon sähkövastusmääritystä varten mittaukset kirjataan vastuksena taajuudella 100 Hz ja sarja-arvoina. Ennen sähkövastuksen mittausta ihon pintajännitystä pienennetään lisäämällä putkeen 70-prosenttista etanolia riittävästi orvaskeden peittämiseksi. Etanoli poistetaan putkesta muutaman sekunnin kuluttua, ja kudos hydratoidaan lisäämällä 3 ml $MgSO_4$-liuosta (154 mM). Mittaussillan elektrodit asetetaan ihonäytteen molemmille puolille vastuksen mittaamiseksi kilo-ohmeina ihonäytettä kohti (kuva 1). Elektrodien mitat ja hauenleukapidikkeen alapuolella olevan elektrodin pituus esitetään kuvassa 2. Sisemmän elektrodin pidike pidetään mittauksen aikana PTFE-putken päällä sen varmistamiseksi, että sama pituusmäärä elektrodia on upotettuna $MgSO_4$-liuokseen. Ulompi elektrodi asetetaan koeastian sisälle siten, että se lepää astian pohjalla. Jousipidikkeen ja PTFE-putken pohjan välinen etäisyys pidetään vakiona (kuva 2), koska tämä etäisyys vaikuttaa mitattavaan vastuksen arvoon. Samoin sisemmän elektrodin ja ihonäytteen välisen etäisyyden on oltava vakio ja mahdollisimman pieni (1–2 mm).

Jos mitattu vastuksen arvo on yli 20 kΩ, se voi johtua siitä, että jäljellä oleva testiaine peittää ihonäytteen orvaskesipinnan. Tätä kerrosta voidaan yrittää poistaa esim. sulkemalla PTFE-putki peukalolla (hansikas kädessä) ja ravistelemalla putkea noin 10 sekuntia; $MgSO_4$-liuos heitetään pois ja vastusmittaus toistetaan tuoreen $MgSO_4$ -liuoksen kanssa.

Testauslaitteiden ominaisuudet ja mitat sekä koemenetelmä voivat vaikuttaa saatuihin ihon sähkövastusarvoihin. Viiden kΩ:n syövyttävyysraja perustuu tässä ohjeessa selostetuilla erityislaitteilla ja -menetelmällä saatuihin mittaustuloksiin. Jos testiolosuhteita muutetaan tai jos käytetään erilaisia laitteita, voi olla tarpeen käyttää eri raja- ja kontrolliarvoja. Siksi on tarpeen kalibroida menetelmä ja vastuksen raja-arvot testaamalla vertailukemikaaleja, jotka on valittu validointitutkimuksessa käytettyjen kemikaalien joukosta (4) (5) tai vastaavista kemikaaliluokista kuin testattavat kemikaalit. Taulukossa 1 on luettelo sopivista vertailukemikaaleista.

▼B

1.5.5. **Väriaineen sitomista mittaavat menetelmät**

Altistus tietyille ei-syövyttäville materiaaleille voi vähentää vastusta alle raja-arvon 5 kΩ ja mahdollistaa ionien pääsyn marraskeden läpi ja sitä kautta vähentää sähkövastusta (5). Esimerkiksi neutraalit orgaaniset aineet ja pinta-aktiiviset kemikaalit (mm. puhdistusaineet, emulgointiaineet ja muut pinta-aktiiviset aineet) voivat poistaa ihon lipidejä ja lisätä ihon läpäisevyyttä ioneille. Niinpä jos testiaineilla saadut ihon sähkövastusarvot ovat alle tai noin 5 kΩ, mutta näkyvää vauriota ei ole, on määritettävä väriaineen tunkeutuminen kontrollinäytteiden ja käsiteltyjen näytteiden kudokseen sen määrittämiseksi, ovatko ihon sähkövastusarvot tulosta ihon läpäisevyyden kasvusta vai ihon syöpymästä (3) (5). Kun on kyse syöpymästä, jossa marraskesi on vaurioitunut, ihon pinnalle aplikoitu sulforodamiini B -väriaine tunkeutuu nopeasti ihoon ja värjää pinnanalaisen kudoksen. Kyseinen väriaine on stabiili useiden eri kemikaalien kanssa, eikä alla kuvattu uuttomenettely vaikuta siihen.

1.5.5.1. *Sulforodamiini B -väriaineen aplikaatio ja poistaminen*

Ihon sähkövastusmäärityksen jälkeen magnesiumsulfaattiliuos poistetaan putkesta. Tämän jälkeen tutkitaan tarkasti, onko ihossa vaurioita. Jos ilmeisiä vaurioita ei ole, kunkin ihonäytteen orvaskesipinnalle aplikoidaan 2 tunniksi 150 µl 10-prosenttista (paino/tilavuus) sulforodamiini B -liuosta (Acid Red 52; C.I. 45100; EINECS-numero 222-529-8; CAS-numero 3520-42-1) tislatussa vedessä. Ihonäytteitä pestään sen jälkeen vesihanan alla huoneenlämpötilassa noin 10 sekuntia liian tai sitoutumattoman väriaineen poistamiseksi. Ihonäytteet poistetaan varovasti PTFE-putkista ja pannaan pulloon (esim. 20 ml:n lasinen tuikelaskentapullo), jossa on deionisoitua vettä (8 ml). Pulloja ravistellaan varovasti 5 minuuttia mahdollisen jäljellä olevan sitoutumattoman väriaineen poistamiseksi. Huuhtelu toistetaan. Ihonäytteet otetaan pulloista, pannaan toisiin pulloihin, joissa on 5 ml 30-prosenttista (paino/tilavuus) natriumdodekyylisulfaattia (SDS) tislatussa vedessä, ja inkuboidaan yli yön 60 °C:ssa.

Inkubaation jälkeen ihonäytteet otetaan pulloista ja heitetään pois. Jäljellä olevaa liuosta sentrifugoidaan 8 minuuttia 21 °C:ssa (suhteellinen keskipakoisvoima ~175 x g). Supernatantista otetaan 1 ml:n näyte, joka laimennetaan 1:5:een (tilavuus/tilavuus) [ts. 1 ml + 4 ml] 30-prosenttisella (paino/tilavuus) SDS:llä tislatussa vedessä. Liuoksen optinen tiheys (OD) mitataan aallonpituudella 565 nm.

1.5.5.2. *Väriaineen pitoisuuden laskeminen*

Sulforodamiini B -väriaineen pitoisuus ihonäytteessä lasketaan OD-arvoista (5) (sulforodamiini B:n molaarinen ekstinktiokerroin aallonpituudella 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; molekyylipaino = 580). Väriaineen pitoisuus ihonäytteessä määritellään käyttämällä sopivaa kalibrointikäyrää, ja väriaineen keskiarvopitoisuus lasketaan sitten rinnakkaisnäytteistä.

2. **TULOKSET**

Testiaineiden ja positiivisten ja negatiivisten kontrollien vastusarvot (kΩ) ja väriainepitoisuuden keskiarvot (µg/näyte) on esitettävä taulukkomuodossa (yksittäiset koetulokset ja keskiarvot ± keskihajonta). Samoin esitetään rinnakkaiskokeista tai toistetuista kokeista saadut tulokset, keskiarvot ja yksittäiset arvot.

▼B

2.1. TULOSTEN TULKINTA

Ihon sähkövastusmittausten keskiarvot hyväksytään, jos samaan aikaan mitatut positiivisten ja negatiivisten kontrollinäytteiden määritysten tulokset ovat tälle menetelmälle määritellyissä hyväksyttävissä rajoissa (testilaboratoriossa). Hyväksyttävät vastusalueet käytettäessä tätä menetelmää ja näitä laitteita esitetään seuraavassa taulukossa:

Kontrolli	Aine	Vastusalue (kΩ)
Positiivinen	10 M kloorivetyhappo	0,5–1,0
Negatiivinen	Tislattu vesi	10–25

Väriaineen sitoutumiskokeen keskiarvotulokset hyväksytään, jos samaan aikaan tehtyjen kontrolliaineiden määritysten tulokset ovat tälle menetelmälle määritellyissä hyväksyttävissä rajoissa. Suositellut kontrolliaineiden hyväksyttävät väriainepitoisuusalueet käytettäessä tätä menetelmää ja näitä laitteita ovat:

Kontrolli	Aine	Väriaineen pitoisuusalue (μg/näyte)
Positiivinen	10 M kloorivetyhappo	40–100
Negatiivinen	Tislattu vesi	15–35

Testiainetta ei katsota ihosyövyttäväksi

i) jos testiaineelle saatu ihon sähkövastusarvo (keskiarvo) on yli 5 kΩ, tai

ii) ihon sähkövastusarvo (keskiarvo) on enintään 5 kΩ, ja

— ihonäytteessä ei ole ilmeisiä vaurioita, ja

— ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus on selvästi vähemmän kuin samanaikaisesti määritetyn positiivisen kontrollin (10M HCl) aiheuttama ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus.

Testiaine katsotaan ihosyövyttäväksi

i) jos ihon sähkövastusarvo (keskiarvo) on enintään 5 kΩ ja ihonäyte on selvästi vaurioitunut tai

ii) ihon sähkövastusarvo (keskiarvo) on enintään 5 kΩ ja

— ihonäytteessä ei ole ilmeisiä vaurioita, mutta

— ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus on sama tai suurempi kuin samanaikaisesti määritetyn positiivisen kontrollin (10M HC1) aiheuttama ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus.

▼B

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrolliaineet:

— kemiallinen nimi, kuten IUPAC- tai CAS-nimi sekä CAS-numero, jos se tiedetään,

— aineen tai valmisteen puhtaus ja koostumus (painoprosentteina), fysikaaliset tila ja puhtaus,

— testin suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet, kuten fysikaalinen tila, pH, stabiilius ja vesiliukoisuus,

— tarvittaessa testi- tai kontrolliaineiden käsittely ennen testiä (esim. lämmittäminen tai jauhaminen),

— stabiilius, jos se tiedetään.

Koe-eläimet:

— käytetty kanta ja sukupuoli,

— eläinten ikä, kun niitä käytetään luovuttajaeläiminä,

— toimittaja, häkit, ravinto jne.,

— tiedot ihonäytteestä.

Testiolosuhteet:

— kalibrointikäyrät testilaitteille,

— kalibrointikäyrät väriaineensitomistestille,

— tiedot ihon sähkövastuksen mittauksiin käytetystä testimenettelystä,

— tiedot väriaineensitomistestissä käytetystä testimenettelystä (tarvittaessa),

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista,

— käytetyt arviointikriteerit.

Tulokset:

— taulukkomuodossa tulokset, jotka on saatu ihon sähkövastuksen ja tarvittaessa värinsitoutumisen määrityksestä yksittäisistä eläimistä ja yksittäisistä ihonäytteistä,

— kuvaus mahdollisista havaituista vaikutuksista.

Tulosten pohdinta.

Päätelmät.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/-Corrosion.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219–255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. in Vitro 12, 471–482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. in Vitro 12, 483–524.

6. OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129–147.

8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf

9. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.

10. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In Vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

11. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

12. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test –modifications and validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507–512.

▼B

13. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial. Toxic. *in Vitro* 6, 191–194.

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709–720.

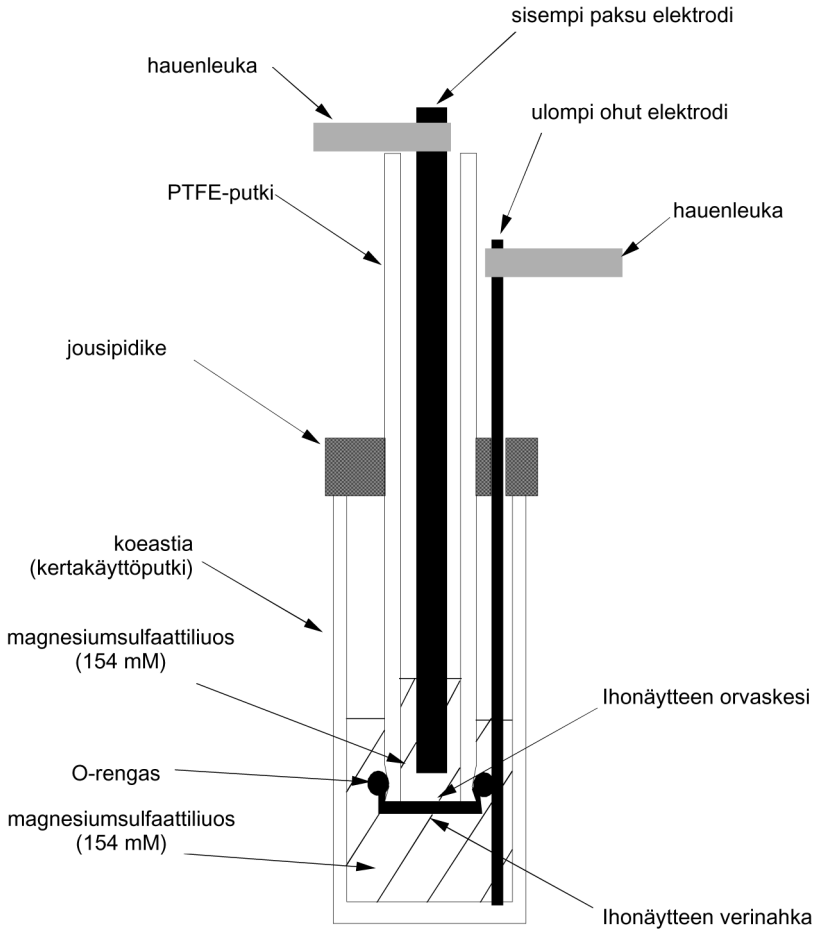
15. Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845–852.

16. Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An *In Vitro* model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxic. in Vitro. 2, 7–17.

▼B

Kuva 1

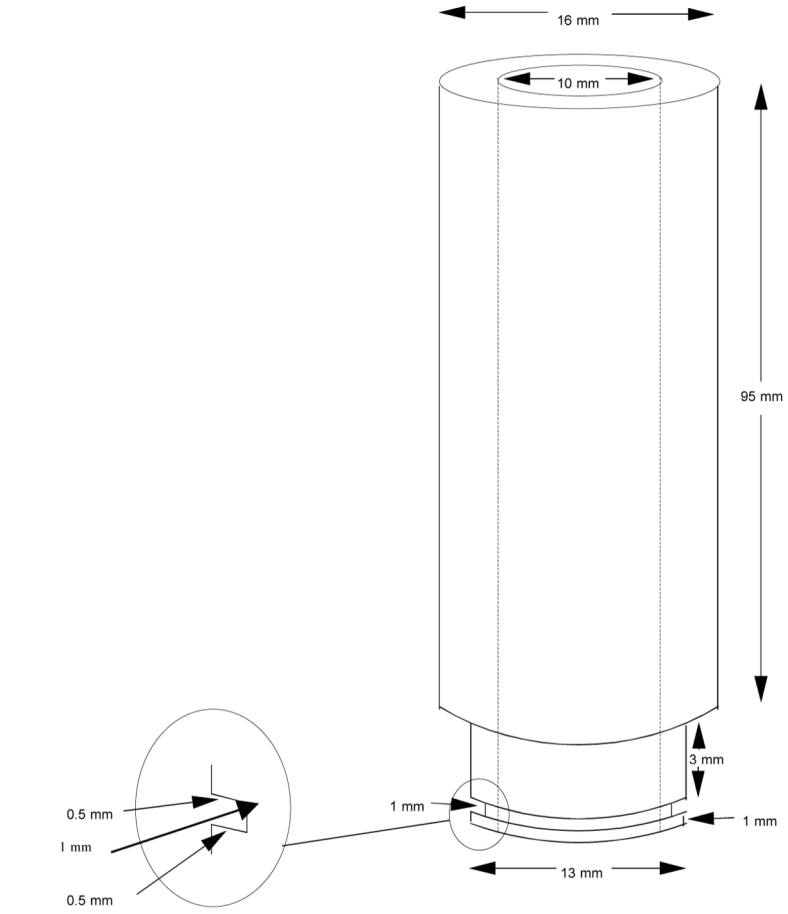
Rotan ihon sähkövastuksen määrityslaite

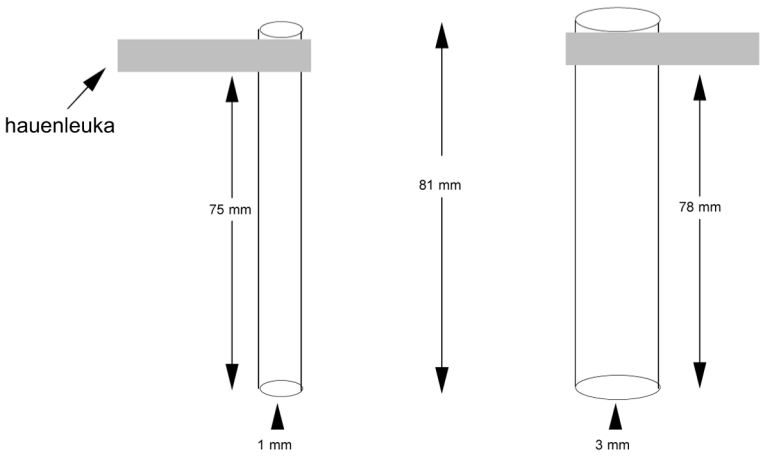


▼B

Kuva 2:

Polytetrafluoroetyleeniputken (PFTE-putken), koeastioiden ja elektrodien mitat





▼B

Yllä kuvattujen laitteiden kriittiset tekijät:

— PTFE-putken sisähalkaisija

— elektrodien pituus suhteessa PTFE-putkeen ja koeastiaan siten, että ihonäyte ei ole kosketuksissa elektrodeihin ja että vakiomitta elektrodia on kosketuksissa MgSO4-liuoksen kanssa

— MgSO4-liuosta on oltava koeastiassa sellainen määrä, että nesteellä on tietty syvyys suhteessa nesteen tasoon PFTE-putkessa (kuvassa 1 esitetyllä tavalla)

— ihonäyte on kiinnitettävä tarpeeksi hyvin PFTE-putkeen, jotta sähkövastus ilmentäisi ihon ominaisuuksia oikein.

▼B

B.40 a. ***IN VITRO* IHOSYÖVYTTÄVYYS: IHMISIHOMALLITESTI**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro TG 431 (2004)

1.1 JOHDANTO

Ihosyövyttävyydellä tarkoitetaan palautumattoman kudosvaurion ilmenemistä ihossa testiaineen aplikaation jälkeen [määritelmä sisältyy GHS-järjestelmään (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures)] (1). Testimenetelmä ei edellytä elävien eläinten tai eläinkudoksen käyttöä ihosyövyttävyyden määrittämiseksi.

Ihosyövyttävyyden arviointi on tyypillisesti edellyttänyt koe-eläinten käyttöä (2). Huoli testissä käytettäville eläimille aiheutuvasta kärsimyksestä on otettu huomioon testimenetelmän B.4 tarkistetussa versiossa, jossa ihosyövyttävyys voidaan määrittää käyttämällä vaihtoehtoisia *in vitro* -menetelmiä, joissa eläimille ei aiheuteta kipua tai kärsimystä.

Sääntelytarkoituksiin käytettävien vaihtoehtoisten ihosyövyttävyystestien kehittäminen aloitettiin validointia edeltävillä tutkimuksilla (3). Tämän jälkeen tehtiin ihosyövyttävyyden arviointiin käytettävien *in vitro* -menetelmien (4) (5) virallinen validointitutkimus (6) (7) (8). Näiden tutkimusten tulokset ja muu julkaistu kirjallisuus (9) johtivat siihen suositukseen, että ihosyövyttävyyden arviointiin *in vivo* voitaisiin käyttää seuraavia testejä (10) (11) (12) (13): ihmisihomallitesti (tässä kuvattu menetelmä) ja sähkövastusmääritystesti (testimenetelmä B.40).

Validointitutkimukset ovat osoittaneet, että ihmisihomalleja käyttävillä testeillä (3) (4) (5) (9) voidaan luotettavasti erottaa tunnetut ihoa syövyttävät kemikaalit sellaisista kemikaaleista, jotka eivät syövytä ihoa. Lisäksi on mahdollista, että testillä voidaan erotella erittäin syövyttäviä kemikaaleja vähemmän syövyttävistä.

Tässä kuvatulla testimenetelmällä voidaan tunnistaa syövyttävät kemialliset aineet ja seokset. Sillä voidaan tunnistaa myös sellaiset aineet ja seokset, jotka eivät syövytä ihoa, kunhan tukena on muista käytettävissä olevista tiedoista saatua näyttöä (esim. pH, rakenneaktiivisuussuhteet, koehenkilöillä ja/tai -eläimillä tehdyistä kokeista saadut tiedot) (1) (2) (13) (14). Se ei yleensä tarjoa riittävää tietoa ihoärsytyksestä, eikä sen perusteella ole mahdollista luokitella syövyttäviä aineita GHS-järjestelmän mukaisiin alaluokkiin (1).

Haluttaessa arvioida kattavasti ihoaltistuksen jälkeiset paikalliset ihovaikutukset suositellaan käytettäväksi testimenetelmän B.4 liitteessä esitettyä monivaiheista testausta (2), joka on esitetty GHS-järjestelmässä (1). Kyseiseen testaukseen kuuluu ihosyövyttävyystestien (tässä kuvattu testimenetelmä) ja ihoärsytystestien suorittaminen *in vitro* ennen testauksen harkitsemista elävillä eläimillä.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ihosyövyttävyys *in vivo:* korjautumattoman ihovaurion eli orvaskeden läpi verinahkaan ulottuvan näkyvän kuolion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testiaineen annostelun jälkeen. Tyypillisiä syöpymisreaktioita ovat haavaumat, verenvuoto, veriset ruvet sekä 14 päivän tarkkailujakson lopussa ihon vaalenemisen aiheuttama värinmuutos, kokonaan kaljuuntuneet alueet ja arvet. Epäselvien vaurioiden tapauksessa olisi harkittava histopalogista tutkimusta.

Solujen elävyys: muuttuja, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta (esim. solujen mitokondrioiden dehydrogenaasien kyky pelkistää väriaine MTT), joka mittaussuureesta ja testimenetelmästä riippuen korreloi solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn.

1.3 VERTAILUAINEET

Taulukko 1

Vertailukemikaalit

Nimi	EINECS-numero	CAS-numero	
1,2-Diaminopropaani	201-155-9	78-90-0	Erittäin syövyttävä
Akryylihappo	201-177-9	79-10-7	Erittäin syövyttävä
2-tert-Butyylifenoli	201-807-2	88-18-6	Syövyttävä
Kaliumhydroksidi (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Syövyttävä
Rikkihappo (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Syövyttävä
Oktaanihappo (kapryylihappo)	204-677-5	124-07-02	Syövyttävä
4-Amino-1,2,4-triatsoli	209-533-5	584-13-4	Ei syövyttävä
Eugenoli	202-589-1	97-53-0	Ei syövyttävä
Fenetyylibromidi	203-130-8	103-63-9	Ei syövyttävä
Tetrakloorietyleeni	204-825-9	27-18-4	Ei syövyttävä
Isosteariinihappo	250-178-0	30399-84-9	Ei syövyttävä
4-(Metyylitio)-bentsaldehydi	222-365-7	3446-89-7	Ei syövyttävä

Useimmat taulukossa mainituista kemikaaleista on valittu ECVAM:in kansainvälisessä validointitutkimuksessa käytettyjen kemikaalien joukosta (4). Ne valittiin seuraavilla perusteilla:

(i) Syövyttäviä ja ei-syövyttäviä aineita on oltava yhtä paljon.

(ii) Niiden on oltava kaupallisesti saatavilla olevia aineita, jotka kattavat useimmat relevantit kemikaaliluokat.

(iii) Mukana on oltava sekä erittäin syövyttäviä että vähemmän syövyttäviä aineita, jotta mahdollistettaisiin syövyttävyysvoimakkuuden mukainen luokittelu.

▼B

(iv) Kemikaaleja on voitava käsitellä laboratoriossa aiheuttamatta vakavia riskejä (syövyttävyyttä lukuun ottamatta).

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta aplikoidaan kolmiulotteiseen ihmisihomalliin, jossa on ainakin rekonstruoitu orvaskesi ja toimiva marraskesi. Syövyttävät materiaalit tunnistetaan niiden kyvystä vähentää solujen elävyyttä [joka arvioidaan esim. MTT:n pelkistyskokeella (15)] määriteltyjen raja-arvojen alapuolelle spesifioitujen altistusaikojen jälkeen. Ihmisihomallimäärityksen periaate perustuu oletukseen, jonka mukaan syövyttäviä kemikaaleja ovat ne, jotka pystyvät tunkeutumaan marrasketeen (diffundoitumalla tai eroosion seurauksena) ja ovat myrkyllisiä soluille allaolevissa solukerroksissa.

1.4.1 **Menettely**

1.4.1.1 *Ihmisihomallit*

Ihmisihomallit voidaan valmistaa tai hankkia kaupallisesti (esim. the EpiDerm™- ja EPISKIN™-mallit) (16) (17) (18) (19) tai ne voidaan kehittää testilaboratoriossa (20) (21). Ihmisihon käyttöön on sovellettava kansallisia ja kansainvälisiä eettisiä käytäntöjä ja ehtoja. Kaikki uudet mallit on validoitava (vähintään kohdassa 1.4.1.1.2 mainituilta osin). Tässä testissä käytettävien ihmisihomallien on täytettävä seuraavassa mainitut ehdot:

1.4.1.1.1 Mallin yleiset ehdot:

Epiteelin valmistamiseen on käytettävä ihmisen keratinosyyttejä. Toimivan marraskeden alla on oltava useita kerroksia eläviä epiteelisoluja. Ihomallissa voi olla myös stroomakerros. Marraskedessa on oltava useita kerroksia ja sopiva lipidiprofiili, jotta se voi tarjota toimivan esteen ja kykenee torjumaan solumyrkyllisten merkkinaineiden nopean tunkeutumisen. Mallin on oltava sellainen, että marraskeden ympärillä olevan materiaalin pääsy elävään kudokseen estyy. Marraskeden ympärillä olevien testikemikaalien pääsy kudokseen heikentää mallin kykyä mallintaa ihoaltistusta. Ihomallissa ei saa olla bakteerikontaminaatiota (esim. mykoplasmat) tai sieni-itiöitä.

1.4.1.1.2 Mallin toimintaa koskevat ehdot:

Elävyyden aste kvantifioidaan yleensä käyttämällä MTT-väriainetta tai muita metabolisesti muuntuvia väriaineita. Näissä tapauksissa negatiivisesta kontrollikudoksesta uutetun (liuotetun) väriaineen optisen tiheyden (OD) on oltava ainakin 20 kertaa suurempi kuin uuttamisliuottimen OD-arvon [yleiset tiedot: katso (22)]. Negatiivisen kontrollikudoksen on oltava stabiili viljelyssä (solujen elävyyttä koskevien mittaustulosten on oltava samanlaisia) testin koko altistusajan. Marraskeden on oltava riittävän vahva, jotta se estää tiettyjen solumyrkyllisten merkkikemikaalien (esim. 1 % Triton X-100) nopean tunkeutumisen. Kyseinen ominaisuus voidaan arvioida sen altistusajan perusteella, joka tarvitaan, jotta solujen elävyys vähenee 50 % (ET_{50}) (esim. EpiDerm™- ja EPISKIN™-malleilla > 2 tuntia). On osoitettava, että kudosta voidaan käyttää toistuvasti ajan myötä ja mielellään laboratorioiden välillä. Lisäksi sen avulla on voitava ennustaa vertailukemikaalien (taulukko 1) syövyttävyyspotentiaali, kun sitä käytetään valitussa testimenettelyssä.

▼B

1.4.1.2. *Testi- ja kontrolliaineen aplikoiminen*

Kutakin käsittelyä (altistusaikaa) kohti käytetään kahta rinnakkaista kudosnäytettä (myös kontrolleista). Nestemäistä testiainetta aplikoidaan riittävä määrä (vähintään 25 $\mu L/cm^2$), että se peittää ihopinnan tasaisesti. Kiinteää testiainetta aplikoidaan riittävä määrä, että se peittää tasaisesti ihon, ja ainetta pitäisi kostuttaa deionisoidulla tai tislatulla vedellä, jotta se olisi hyvin kosketuksissa ihoon. Tarvittaessa kiinteät aineet on jauhettava aplikointia varten. Aplikaatiomenetelmän on sovelluttava testiaineelle (katso esim. kirjallisuusviite 5). Altistuksen jälkeen testiaine pestään huolellisesti ihon pinnalta sopivalla puskuriliuoksella tai 0,9 % NaCl:lla.

Kussakin testissä on tehtävä samaan aikaan positiiviset ja negatiiviset kontrollimääritykset, jotta voidaan varmistaa testimallin riittävä suorituskyky. Suositeltavat positiiviset kontrolliaineet ovat jääetikka tai 8N KOH. Suositellut negatiiviset kontrollit ovat 0,9 % NaC1 tai vesi.

1.4.1.3 *Solujen elävyysmittaukset*

Solujen elävyyden määrittämiseksi voidaan käyttää vain kvantitatiivisia ja validoituja menetelmiä. Lisäksi elävyyden määrityksen on sovelluttava kolmiulotteiseen kudosrakenteeseen. Ei-spesifinen väriaineen sitominen ei saa vaikuttaa solujen elävyyden määritykseen. Proteiineja sitovat väriaineet ja väriaineet, jotka eivät muunnu metabolisesti (esim. neutraalipuna), eivät sen vuoksi ole sopivia. Tavallisin määritysmenetelmä on MTT:n 3-(4,5-dimetyylitiatsol-2yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi, tiatsolyylisininen: EINECS-numero 206-069-5, CAS-numero 298-93-1)] pelkistys. MTT:n on osoitettu antavan tarkkoja ja toistettavia tuloksia (5), mutta myös muita voidaan käyttää. Ihonäyte pannaan MTT-liuokseen, jonka pitoisuus on sopiva (esim. 0,3–1 mg/ml), sopivassa inkubointilämpötilassa 3 tunniksi. Saostunut sininen formatsaani uutetaan liuottimella (isopropanoli), ja formatsaanipitoisuus määritetään mittaamalla OD-arvo aallonpituudella 540–595 nm.

Testiaineen kemiallinen reaktio vitaaliväriaineen kanssa voi jäljitellä solujen aineenvaihduntaa, mikä voi johtaa väärään arvioon solujen elävyydestä. Tämän on osoitettu tapahtuvan, jos testiainetta ei ole kokonaan poistettu iholta huuhtelemalla (9). Jos testiaine reagoi suoraan vitaaliväriaineen kanssa, on käytettävä lisäkontrolleja, jotta voidaan havaita ja korjata testiaineen vaikutus solujen elävyyden mittaukseen (9) (23).

2. **MITTAUSTULOKSET**

Testiaineiden sekä positiivisten ja negatiivisten kontrollien OD-arvot ja lasketut prosentuaaliset solujen elävyysarvot olisi esitettävä kunkin kudosnäytteen osalta taulukkomuodossa, sekä myös tulokset rinnakkaiskokeista tai toistetuista kokeista (tarvittaessa), keskiarvot ja yksittäiset arvot.

▼B

2.1 TULOSTEN TULKINTA

Negatiivisen kontrollin OD-arvon katsotaan testissä edustavan 100-prosenttista solujen elävyyttä. Siksi kullekin testinäytteelle saaduista OD-arvoista voidaan laskea solujen elävyys prosentteina negatiivisesta kontrollista. Prosentuaalinen solujen elävyyden raja-arvo, jolla erotetaan syövyttävät testiaineet ei-syövyttävistä (tai eri syövyttävyysluokat), taikka tulosten arviointiin ja syövyttävien aineiden tunnistamiseen käytettävät tilastomenetelmät, on määriteltävä selvästi ja dokumentoitava ja niiden on osoitettava olevan soveltuvia. Yleensä nämä erottelevat arvot määritetään testin optimoinnin aikana, testataan validointia edeltävässä vaiheessa ja vahvistetaan validointitutkimuksessa. Esimerkiksi EpiDerm^{TM}-mallilla syövyttävyys ennustetaan seuraavasti (9):

Testiaine on syövyttävä iholle:

i) jos solujen elävyys kolmen minuutin altistuksen jälkeen on alle 50 % tai

ii) jos solujen elävyys kolmen minuutin altistuksen jälkeen on 50 % tai suurempi ja yhden tunnin altistuksen jälkeen alle 15 %.

Testiaine ei ole syövyttävä iholle:

i) jos solujen elävyys kolmen minuutin altistuksen jälkeen on 50 % tai suurempi ja yhden tunnin altistuksen jälkeen 15 % tai suurempi.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrolliaine:

— kemiallinen nimi, kuten IUPAC- tai CAS-nimi sekä CAS-numero, jos se tiedetään,

— aineen tai valmisteen puhtaus ja koostumus (painoprosentteina),

— testin suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet, kuten fysikaalinen tila, pH, stabiilius ja vesiliukoisuus,

— tarvittaessa testi- tai kontrolliaineiden käsittely ennen testiä (esim. lämmittäminen tai jauhaminen),

— stabiilius, jos se tiedetään.

Käytetyn ihomallin ja testisuunnitelman perustelut.

Testiolosuhteet:

— käytetty solujärjestelmä,

— solujen elävyysmäärityksessä käytetyn mittauslaitteen (esim. spektrofotometri) kalibrointiedot,

▼B

— täydelliset tiedot käytetyn spesifisen ihomallin tueksi (mm. mallin validointiaste),

— tiedot käytetystä testimenettelystä,

— käytetyt testiannokset,

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista,

— viittaukset mallia koskeviin aiempiin tietoihin,

— käytetyt arviointikriteerit.

Tulokset:

— yksittäisistä testinäytteistä saadut tulokset taulukkomuodossa,

— kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23,219–255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. *In Vitro* 12, 471–482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. *In Vitro* 12, 483–524.

6. OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129–147.

8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼B

9. Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp.371–401.

10. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.

11. ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365–67.

12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

13. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st–2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709–720.

15. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, 55–63.

16. Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. In Vitro 8, 889–891.

17. Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211–225.

18. Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In In vitro Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133–140

19. Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). In vitro and post -transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193: 310–319

20. Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163–171.

21. Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, 747–756.

▼B

22. Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, 69–84.

23. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. InVItro 15, 57–93.

▼B

B.41. *IN VITRO* 3T3 NRU -VALOMYRKYLLISYYSTESTI

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 432 (2004).

1.1 JOHDANTO

Valomyrkyllisyys on kehon toksinen vaste, joka ilmenee tai kasvaa (todettavissa pienemmillä annoksilla), kun keholle on aplikoitu kyseistä ainetta ja iho on altistettu valolle, tai jonka aiheuttaa ihon säteilytys sen jälkeen, kun ainetta on annettu elimistöön.

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestiä käytetään tunnistamaan testiaineen valomyrkyllisyyspotentiaali sen jälkeen, kun valo on eksitoinut sen valolle altistuksen jälkeen. Testillä arvioidaan fotosytotoksisuus kemikaalille altistuneiden solujen elävyyden vähenemisenä valoaltistuksessa verrattuna tilanteeseen, jossa ei ole valoaltistusta. Tällä testillä tunnistetut aineet ovat todennäköisesti valomyrkyllisiä *in vivo* elimistöön annettuna ja ihoon jakautuneina tai aplikoituina iholle paikallisesti.

Useantyyppisten kemikaalien on ilmoitettu olevan valomyrkyllisiä (1) (2) (3) (4). Niiden yhteinen ominaisuus on kyky absorboida energiaa auringonvalon spektrialueella. Valokemian ensimmäisen lain (Grotthaus-Draperin lain) mukaan valoreaktio edellyttää riittävää valokvanttien absorptiota. Tämä merkitsee sitä, että ennen kuin harkitaan biologista testausta, testikemikaalin absorptiospektri UV-valon ja näkyvän valon alueella on määritettävä OECD:n testiohjeen 101 mukaisesti. On esitetty, että jos kemikaalin mooliekstinktio- tai absorptiokerroin on pienempi kuin 10 litraa × mol-1 × cm-1, kemikaalilla ei todennäköisesti ole valoreaktiokykyä eikä sitä todennäköisesti tarvitse testata *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestillä tai millään muulla haitallisia valokemiallisia vaikutuksia määrittävällä biologisella testillä (1) (5). Katso myös liite 1.

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin luotettavuus ja relevanssi on arvioitu hiljattain (6) (7) (8) (9). *In vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin osoitettiin kykenevän ennustamaan akuutteja valomyrkyllisyysvaikutuksia eläimissä ja ihmisissä *in vivo*. Testin tarkoituksena ei ole ennustaa muita kemikaalien ja valon yhteisvaikutuksesta aiheutuvia haitallisia vaikutuksia, esim. fotogenotoksisuutta, valoallergiaa ja fotokarsinogeenisuutta. Testi ei pysty myöskään arvioimaan aineen valomyrkyllisyyspotenssia kvantitatiivisesti. Sen tarkoituksena ei myöskään ole arvioida valomyrkyllisyyden epäsuoria mekamismeja, testiaineen metaboliittien vaikutuksia tai sekoitusten vaikutuksia.

Vaikka metaboloivia järjestelmiä yleensä tarvitaan kaikissa *in vitro* -testeissä, joilla ennustetaan genotoksisuutta ja karsinogeenisuutta, tunnetaan toistaiseksi vain harvoja kemikaaleja, jotka edellyttäisivät metabolista aktivaatiota, jotta ne voisivat olla valomyrkyllisiä *in vivo* tai *in vitro*. Siten ei katsota olevan tarpeellista eikä tieteellisesti perusteltua suorittaa tätä testiä metabolisen aktivaatiojärjestelmän kanssa.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT

Säteilyvoimakkuus: pintaan kohdistuvan ultraviolettivalon (UV) tai näkyvän valon (VIS) intensiteetti mitattuna watteina neliömetriä kohti tai watteina neliösenttimetriä kohti (W/m^2 tai mW/cm^2).

Valoannos: pintaan kohdistuvan ultraviolettisäteilyn (UV) tai näkyvän valon säteilyn määrä (= intensiteetti × aika) ilmaistuna jouleina (= W × s) pinta-alayksikköä kohti, esim. J/m^2 tai J/cm^2.

UV-valon aallonpituusalueet: Kansainvälisen valaistustoimikunnan (ICI) suosittelemat määritelmät ovat: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) ja UVC (100–280 nm). Muitakin määritelmiä käytetään: UVB- ja UVA-alueen raja asetetaan usein 320 nanometriin ja UVA-alue voidaan jakaa alueisiin UV-A1 ja UV-A2, jolloin raja on noin 340 nanometrissä.

Solujen elävyys: muuttuja, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta (esim. neutraalipunan ottoa solujen lysosomeihin), joka mittaussuureesta ja testimenetelmästä riippuen korreloi solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn.

Suhteellinen solujen elävyys: solujen elävyys ilmaistuna suhteessa liuotinkontrolleihin (negatiivisiin kontrolleihin), jotka käyvät läpi testin muuten (joko +Irr tai -Irr), mutta joita ei ole käsitelty testikemikaalilla.

PIF (valoärsyttävyystekijä): tekijä, joka muodostetaan vertaamalla testikemikaalin kahta yhtä tehokasta solumyrkyllisyyspitoisuutta (IC50) sen jälkeen, kun soluja säteilytetään UVA-/näkyvällä valolla (+Irr), joka ei ole solumyrkyllistä, ja kun soluja ei säteilytetä (-Irr).

IC_{50}: testikemikaalin pitoisuus, jossa solujen elävyys on vähentynyt 50 %

MPE (keskimääräinen valovaikutus): suure, joka saadaan analysoimalla matemaattisesti pitoisuus-vastekuvaajat, jotka on saatu, kun soluja säteilytetään UVA-/näkyvällä valolla (+Irr), joka ei ole solumyrkyllistä, ja kun soluja ei säteilytetä (-Irr).

Valomyrkyllisyys: akuutti toksinen vaste, joka ilmenee sen jälkeen, kun iho on ensimmäisen kerran altistettu tietyille kemikaaleille ja sen jälkeen valolle, tai jonka ihon säteilytys aiheuttaa samalla tavalla sen jälkeen, kun kemikaalia on annettu elimistöön.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystesti perustuu kemikaalin solumyrkyllisyyden vertaamiseen, kun kemikaalia testataan altistettaessa kohdetta sellaiselle simuloidulle auringonvalolle, joka ei ole solumyrkyllinen, ja ilman tällaista valoaltistusta. Solumyrkyllisyys ilmaistaan tässä testissä pitoisuudesta riippuvana neutraalipunan (vitaaliväri) soluunoton vähenemisenä 24 tuntia kemikaalikäsittelyn ja säteilytyksen jälkeen (10). Neutraalipuna on heikosti kationinen väriaine, joka läpäisee solukalvot muulla tavalla kuin diffundoitumalla ja keräytyy solunsisäisiin lysosomeihin. Lysosomien herkän kalvon pinnan muutokset johtavat lysosomien haurastumiseen ja muihin muutoksiin, joista tulee vähitellen peruuttamattomia. Tällaiset vierasaineiden toiminnan aikaansaamat muutokset johtavat neutraalipunan oton ja sitoutumisen vähenemiseen. Tämän perusteella on mahdollista erotella elinkykyiset, vaurioituneet ja kuolleet solut, mikä on perustana tälle testille.

▼B

Balb/c 3T3 -soluja viljellään 24 tuntia yhden solun vahvuisen kerroksen aikaansaamiseksi. Kutakin testikemikaalia kohti inkuboidaan aluksi yhden tunnin ajan kahta 96 kuopan levyä, joissa on kahdeksaa eri pitoisuutta testattavaa kemikaalia Sen jälkeen toinen levyistä altistetaan suurimmalle ei-solumyrkylliselle säteilytysannokselle ja toinen levy pidetään pimeässä. Sitten kummankin levyn käsittelyneste korvataan viljelynesteellä, inkuboidaan toiset 24 tuntia, ja määritetään solujen elävyys neutraalipunan ottona. Solujen elävyys, joka ilmaistaan prosenttiosuutena käsittelemättömistä liuotinkontrolleista, lasketaan kullekin testipitoisuudelle. Valomyrkyllisyyskyvyn ennustamiseksi verrataan pitoisuusvasteita, jotka on saatu säteilytyksen kanssa ja ilman sitä, yleensä IC_{50}-tasolla, ts. siinä pitoisuudessa, joka vähentää solujen elävyyttä 50 prosentilla verrattuna käsittelemättömiin kontrolleihin.

1.4 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelut**

1.4.1.1 *Solut*

Validointitutkimuksessa käytettiin joko ATCC:stä (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) tai ECACC:stä (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK) hankittua pysyvää hiiren fibroblastisolulinjaa Balb/c 3T3, kloonia 31, ja siksi sen hankkimista suositellaan (laadukkaasta solupankista). Muita soluja tai solulinjoja voidaan käyttää, kun testimenettely on sama, jos viljelyolosuhteet mukautetaan solujen erityistarpeisiin. Samanlaisuus on tällöin osoitettava.

Mykoplasmakontaminaatio on tutkittava säännöllisesti, ja soluja saa käyttää vain jos mykoplasmakontaminaatiota ei todeta (11).

On tärkeää, että solujen UV-herkkyys tarkistetaan säännöllisesti tässä menetelmässä selostetun laadunvalvontamenettelyn mukaisesti. Koska solujen UVA-herkkyys voi lisääntyä siirrostamisten myötä, pitäisi käyttää sellaisia Balb/c 3T3 -soluja, joita on siirrostettu mahdollisimman harvoja kertoja, mieluiten alle 100 kertaa. (Katso kohta 1.4.2.2.2 ja liite 2).

1.4.1.2 *Kasvatusväliaineet ja viljelyolosuhteet*

Sopivaa viljelynestettä ja inkubaatio-olosuhteita olisi käytettävä solujen tavanomaiseen siirrostamiseen ja testin aikana. Esimerkiksi Balb/c 3T3 -soluille käytetään DMEM:iä (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), jossa on 10 % vastasyntyneen vasikan seerumia, 4 mM glutamiinia, penisilliiniä (100 IU) ja streptomysiiniä (100 µg/mL), ja soluja inkuboidaan kaapissa, jonka lämpötila on 37 °C ja CO2-pitoisuus 5–7,5 % riippuen puskurista (katso kohdan 1.4.1.4 toinen alakohta). On erityisen tärkeää, että viljelyolosuhteet ovat sellaiset, että solusykli pysyy samanlaisena kuin se käytetyillä soluilla tai solulinjalla on aiemminkin ollut.

1.4.1.3 *Viljelmien valmistelu*

Pakastetuista varastoviljelmistä otettuja soluja inokuloidaan viljelynesteeseen sopivassa tiheydessä, ja niitä siirrostetaan vähintään kerran ennen kuin ne käytetään *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä.

▼B

Valomyrkyllisyystestiä varten soluja inokuloidaan viljelynesteeseen sellaisessa tiheydessä, että viljelmät eivät ole konfluentteja testin päättyessä 48 tunnin kuluttua solujen inokuloinnista, kun solujen elävyys määritetään. Balb/c 3T3 -soluille, joita viljellään 96-kuoppalevyillä, suositellaan solutiheyttä 1×10^4 solua kuoppaa kohti.

Kutakin testikemikaalia varten soluja inokuloidaan täysin samalla tavalla kahdelle erilliselle 96-kuoppalevylle, jotka käyvät läpi samanaikaisesti koko testiohjelman täysin samanlaisissa olosuhteissa, lukuun ottamatta aikaa, jolloin yhtä kuoppalevyä säteilytetään (+Irr) ja toinen pidetään pimeässä (-Irr).

1.4.1.4 *Testiaineen valmistaminen*

Testikemikaalit on valmistettava välittömästi ennen käyttöä, ellei tiedoista ilmene, että ne pysyvät stabiileina varastoitaessa. Kaikki kemikaalien käsittely ja valmistelu suositellaan tehtäväksi sellaisissa valo-olosuhteissa, että vältetään testettavan aineen valoaktivaatio tai hajoaminen ennen säteilytystä.

Testikemikaali pitäisi liuottaa puskuroituun suolaliuokseen, esim. Earlin tasapainotettuun suolaliuokseen (EBSS) tai muihin fysiologisesti tasapainoisiin puskuriliuoksiin, joissa ei saa olla proteiineja tai valoa absorboivia aineita (esim. pH-indikaattorivärejä ja vitamiineja), etteivät ne häiritsisi reaktioita säteilytyksen aikana. Koska soluja pidetään säteilytyksen aikana noin 50 minuuttia CO_2-inkubaattorin ulkopuolella, on vältettävä huolellisesti alkalisaatio. Käytettäessä laimeita puskureita, kuten EBSS:ää, tähän päästään inkuboimalla soluja siten, että CO_2 -pitoisuus on 7,5 %. Jos solut inkuboidaan ainoastaan 5 prosentin CO_2 -pitoisuudella, olisi valittava voimakkaampi puskuri.

Huonosti vesiliukoiset testikemikaalit pitäisi liuottaa sopivaan liuottimeen. Jos käytetään liuotinta, sitä on oltava vakiotilavuudessa kaikissa viljelmissä, ts. negatiivisissa kontrolleissa (liuotinkontrolleissa) ja kaikissa testikemikaalipitoisuuksissa, ja se ei saa olla solumyrkyllistä käytetyssä pitoisuudessa. Testikemikaalipitoisuudet olisi valittava siten, että vältetään liuoksen saostuminen tai sameus.

Dimetyylisulfoksidi (DMSO) ja etanoli (ETOH) ovat suositeltavia liuottimia. Myös muut liuottimet, jotka eivät ole kovin solumyrkyllisiä, voivat olla sopivia. Kaikkien liuottimien erityisominaisuudet (esim. reaktiivisuus testikemikaalin kanssa, valomyrkyllisyysvaikutuksen vaimeneminen, radikaalien sitomisominaisuus ja/tai kemiallinen stabiilius) on arvioitava ennen käyttöä.

Vortex-sekoitusta ja/tai ultraäänihajoitusta ja/tai lämmittämistä sopiviin lämpötiloihin voidaan käyttää liukenemisen helpottamiseksi, kunhan tämä ei vaikutatestikemikaalin stabiiliuteen.

▼B

1.4.1.5 *Säteilytysolosuhteet*

1.4.1.5.1 Valolähde

Sopivan valolähteen ja sopivien suodattimien valitseminen on keskeinen asia valomyrkyllisyyden testauksessa. UVA ja näkyvä valo liittyvät yleensä valomyrkyllisiin reaktioihin *in vivo* (3) (12), kun taas UVB on vähemmän tärkeä, mutta soluille erittäin myrkyllinen. Sen solumyrkyllisyys lisääntyy 1 000-kertaiseksi aallonpituudelta 313 nm aallonpituudelle 280 nm (13). Perusteena sopivan valolähteen valitsemiseen pitäisi olla mm. vaatimus, että valolähde emittoi aallonpituuksia, joita testikemikaali absorboi (absorptiospektri), ja että valoannoksen (joka pitää saavuttaa järkevässä ajassa) pitäisi olla riittävä tunnettujen fotosytotoksisten kemikaalien osoittamiseksi. Lisäksi käytetyt aallonpituudet ja annokset eivät saisi olla liian tuhoisia testijärjestelmälle; tällainen vaikutus olisi mm. lämpö (infrapuna-alue).

Simuloitua auringonvaloa pidetään parhaimpana keinotekoisena valolähteenä. Suodatetun auringonvalosimulaattorin valon säteilytehojakauman olisi oltava lähellä auringonvalon säteilytehojakaumaa (14). Sekä ksenonkaarilamppuja että (seostettuja) elohopeahalidikaarilamppuja käytetään auringonvalosimulaattoreina (15). Jälkimmäisillä on se etu, että ne muodostavat vähemmän lämpöä ja ovat halvempia, mutta niiden spektri ei vastaa auringonvalon spektriä yhtä hyvin kuin ksenonkaarilampuissa. Koska kaikki auringonvalosimulaattorit lähettävät huomattavia määriä UVB-valoa, niiden valo pitäisi suodattaa sopivasti erittäin solumyrkyllisten UVB-aallonpituuksien vaimentamiseksi. Koska soluviljelmissä käytettävät muovimateriaalit sisältävät UV-stabilisaattoreja, spektri pitäisi mitata samantyyppisen 96-kuoppalevyn kannen läpi, jollaista käytetään määrityksessä. Huolimatta laitteiston väistämättömistä suodatinvaikutuksista tai toimenpiteistä, joilla spektrin osia vaimennetaan suodattamalla, näin suodatetun valon spektri ei saisi poiketa standardiauringonvalosta (14). Viitteissä (8) ja (16) annetaan esimerkki *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin validointitutkimuksessa käytetyn auringonvalosimulaattorin suodatetun valon spektrijakaumasta. Katso myös liitteen 2 kuva 1.

1.4.1.5.2 Dosimetria

Valon voimakkuus (säteilyvoimakkuus, radianssi) olisi tarkistettava säännöllisesti ennen jokaista valomyrkyllisyystestiä käyttämällä sopivaa leveäkaistaista UV-mittaria. Voimakkuus olisi mitattava käyttäen samantyyppistä 96-kuoppalevyn kantta kuin itse testissä. UV-mittarin on oltava kalibroitu valolähteen suhteen. Sen suorituskyky pitäisi tarkistaa, mitä varten suositetaan toisen, samantyyppisen ja täysin samalla tavalla kalibroidun vertailu-UV-mittarin käyttöä. On toivottavaa, että tasaisin välein käytettäisiin spektrometriä suodatetun valolähteen säteilyvoimakkuusspektrin mittaamiseen ja leveäkaista-UV-mittarin kalibroinnin tarkistamiseen.

On todettu, että annos 5 J/cm^2 (UVA-alueella mitattuna) ei ollut myrkyllinen Balb/c 3T3 -soluille ja että se pystyi eksitoimaan kemikaaleja siten, että ilmeni valomyrkyllisiä vaikutuksia (6) (17). Esimerkiksi arvo 5 J/cm^2 saavutettiin 50 minuutin aikana säätämällä säteilyvoimakkuus arvoon 1,7 mW/cm^2 (ks. liitteen 2 kuva 2). Jos käytetään muuta solulinjaa tai eri valolähdettä, säteilytysannos voi olla tarpeen kalibroida, jotta voidaan valita annos, joka ei vahingoita soluja, mutta riittää valomyrkyllisten standardiaineiden eksitoimiseksi. Valoaltistusaika lasketaan seuraavasti:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{irradiation dose } (J \,/\, cm^2) \times 1000}{\text{irradiance } (mW \,/\, cm^2) \times 60} \qquad (1\ J = 1\ Wsec)$$

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Testiaineiden pitoisuudet*

Valon kanssa (+ Irr) ja ilman sitä (- Irr) testattavan kemikaalin pitoisuusalue on määritettävä riittävän laajasti pitoisuusalueenmäärittelykokeissa. Voi olla tarpeen määritellä liukoisuus alussa ja 60 minuutin kuluttua (riippuen käsittelyajasta), koska liukoisuus voi muuttua ajan myötä tai altistuksen aikana. Jotta vältettäisiin epäasianmukaisten viljelyolosuhteiden tai hyvin happamien tai alkalisten kemikaalien aiheuttama myrkyllisyys, soluviljelmien, joihin on lisätty testikemikaali, pH:n pitäisi olla välillä 6,5–7,8.

Testiaineen suurimman pitoisuuden pitäisi olla fysiologisten testiolosuhteiden rajoissa eli pitäisi välttää osmoottista ja pH-stressiä. Testikemikaalista riippuen voi olla tarpeen ottaa huomioon myös muita fysikokemiallisia ominaisuuksia, jotka voivat asettaa rajoituksia suurimmalle testipitoisuudelle. Kun on kyse suhteellisen huonoliukoisista aineista, jotka eivät ole myrkyllisiä kyllästymispisteessä tai sitä alemmilla pitoisuuksilla, suurin saavutettavissa oleva pitoisuus olisi testattava. Testikemikaalin saostumista olisi yleisesti vältettävä kaikilla testipitoisuuksilla. Testiaineen suurin pitoisuus ei saisi olla yli 1 000 μg/mL; osmolaarisuus ei saisi olla yli 10mMol. Olisi käytettävä geometrista laimennussarjaa, jossa on kahdeksan testiaineen pitoisuutta ja laimennuskerroin vakio (katso kohta 2.1, toinen alakohta).

Jos (pitoisuusalueenmäärittelykokeiden perusteella) tiedetään, että testikemikaali ei ole myrkyllinen soluille edes suurimmassa pitoisuudessa pimeäkokeessa (-Irr), mutta on erittäin myrkyllinen soluille säteilytettäessä (+ Irr), voi olla tarpeen valita (+ Irr)-kokeeseen eri pitoisuusalue kuin (- Irr)-kokeeseen, jotta mittaustulosten riittävää laatua koskevat vaatimukset täyttyvät.

1.4.2.2 *Kontrollit*

1.4.2.2.1 Solujen säteilyherkkyys ja sen muuttumisen tarkistaminen:

Solujen herkkyys valolähteelle pitäisi tarkistaa säännöllisesti (noin joka viidennen siirrostamisen jälkeen) arvioimalla niiden elävyys sen jälkeen, kun niitä on altistettu suuremmille säteilytysannoksille. Tässä arvioinnissa pitäisi käyttää useita säteilytysannoksia, myös huomattavasti suurempia kuin 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä käytetyt. Annokset voidaan kvantifioida helpoimmin mittaamalla valolähteen UV-valon määrä. Solut inokuloidaan tiheydessä, jota käytetään *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä, ja säteilytetään seuraavana päivänä. Solujen elävyys määritellään yhtä päivää myöhemmin neutraalipunan ottona. On osoitettava, että suurin ei-solumyrkyllinen annos (esim. validointitutkimuksessa 5 J/cm^2 [UVA]) oli riittävä vertailukemikaalien luokittelemiseksi (taulukko) oikein.

▼B

1.4.2.2.2 Säteilyherkkyys, testin tarkistaminen:

Testi täyttää laatuvaatimukset, jos säteilytettyjen negatiivisten kontrollien (liuotinkontrollien) elävyys on yli 80 % verrattuna säteilyttämättömiin negatiivisiin kontrolleihin (liuotinkontrolleihin).

1.4.2.2.3 Liuotinkontrollien elävyys:

Liuotinkontrollien neutraalipunauutteesta mitattu absoluuttinen optinen tiheys (OD540 NRU) osoittaa, ovatko kuoppaa kohti inokuloidut 1×10^4 solua lisääntyneet normaalilla nopeudella määritykseen kuuluvien kahden päivän aikana. Testi täyttää hyväksymisvaatimukset, jos käsittelemättömien kontrollien keskimääräinen $OD540_{NRU}$ on ≥ 0,4 (noin 20 kertaa liuottimen tausta-absorbanssi).

1.4.2.2.4 Positiivinen kontrolli:

Kussakin *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä on testattava samanaikaisesti jokin tunnetusti valomyrkyllinen kemikaali. Käytettäväksi suositellaan klooripromatsiinia (CPZ). CPZ:n testaukselle *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyyden standardiprotokollassa määriteltiin seuraavat hyväksyntävaatimukset: CPZ, säteilytetty (+ Irr): IC_{50} = 0,1-2,0 g/ml; CPZ, ei säteilytetty (- Irr): IC50 = 7,0 -90,0 µg/ml. Valoärsyttävyystekijän (PIF) pi täisi olla > 6. Positiivisen kontrollin suorituskykyä olisi seurattava pitkän ajan kuluessa.

Klooripromatsiinin sijasta voidaan samanaikaisesti testattavina positiivisina kontrolleina käyttää muita valomyrkyllisiä kemikaaleja, jotka sopivat kyseessä olevalle kemikaaliluokalle tai arvioitavana olevan kemikaalin liukoisuusominaisuuksiin.

1.4.3 **Testimenetelmä (6) (7) (8) (16) (17):**

1.4.3.1 *1. päivä:*

Pipetoidaan 100 µlviljelynestettä 96-mikrotitterikuoppalevyn laitimmaisiin kuoppiin (= nollakokeet). Muihin kuoppiin pipetoidaan 100 µlsolususpensiota, jossa on 1×10^5 solua/ml viljelynesteessä (= 1×10^4 solua/kuoppa). Kullekin yksittäisen testiaineen pitoisuuksien sarjalle sekä liuotin- ja positiivisille kontrolleille on valmistettava kaksi levyä.

Soluja inkuboidaan 24 h (katso kohta 1.4.1.2), kunnes ne muodostavat puoliksi konfluentin yhden solun vahvuisen kerroksen. Tässä ajassa solut toipuvat, tarttuvat levyn pohjaan ja alkavat kasvaa eksponentiaalisesti.

1.4.3.2 *2. päivä:*

Inkubaation jälkeen viljelyneste kaadetaan kuopista pois ja solut pestään huolellisesti 150 µl:lla puskuriliuosta, jota käytettiin inkubaatiossa. Lisätään 100 µL puskuria, jossa on testikemikaalia tai liuotinta (liuotinkontrolli). Kuoppiin lisätään kahdeksaa eri pitoisuutta testikemikaalia. Soluja inkuboidaan testikemikaalin kanssa pimeässä 60 minuuttia (katso kohta 1.4.1.2 ja kohta 1.4.1.4, toinen alakohta).

Kullekin yksittäisen testiaineen pitoisuuksien sarjalle sekä kontrolleille valmistetuista kahdesta levystä valitaan yksi (yleensä sattumanvaraisesti) sytotoksisuuden määritystä varten (- Irr) (kontrollilevy) ja toinen (testilevy) fotosytotoksisuuden määritystä varten (+ Irr).

▼B

Testin (+ Irr)-osaa varten soluja säteilytetään huoneenlämpötilassa 50 minuuttia 96-kuoppalevyn kannen läpi suurimmalla ei-solumyrkyllisellä säteilyannoksella (katso myös liite 2). Säteilyttämättömät levyt (- Irr) pidetään huoneenlämpötilassa pimeässä laatikossa 50 min (= valoaltistusaika).

Testiliuos kaadetaan pois ja solut pestään huolellisesti kahdesti 150 µl:lla puskuriliuosta, jota käytettiin inkubaatiossa, mutta jossa ei ole testiainetta. Puskuri korvataan viljelynesteellä, ja soluja inkuboidaan (katso kohta 1.4.1.2) yli yön (18–22 h).

1.4.3.3 *3. päivä:*

1.4.3.3.1 Mikroskooppitutkimus

Solujen lisääntyminen, morfologia ja yhden solun vahvuisen kerroksen eheys on tutkittava käyttäen faasikontrastimikroskooppia. Solujen muodonmuutokset ja vaikutukset solujen lisääntymiseen on kirjattava.

1.4.3.3.2 Neutraalipunatesti

Solut pestään 150 µl:lla esilämmitettyä puskuriliuosta. Pesuliuos kaadetaan pois ravistamalla levyä varovasti. Kuoppiin lisätään 100 € neutra alipunaa (NR) (3-amino-7-dimetyyliamino-2-metyylifenatsiinihydrokloridi, EINECS-numero 209-035-8; CAS-numero 553-24-2; C.I. 50040) viljelynesteessä ilman seerumia (16) ja soluja inkuboidaan 3 tunnin ajan kohdassa 1.4.1.2 kuvatulla tavalla. Inkubaation jälkeen NR-viljelyneste poistetaan ja solut pestään 150 µl:lla puskuriliuosta. Puskuriliuos kaadetaan pois ja kuopat kuivataan täysin imeyttäen neste paperiin tai sentrifugoimalla.

Lisätään tarkasti 150 µl NR-desorbointiliuosta (juuri valmistettu, 49 osaa vettä + 50 osaa etanolia + 1 osa etikkahappoa).

Mikrotitterilevyä heilutetaan varovasti ravistajassa 10 minuutin ajan, kunnes NR on uuttunut soluista ja muodostanut tasaisen liuoksen.

NR-uutteen optinen tiheys luetaan aallonpituudella 540 nm spektrofotometrissä käyttäen vertailuliuoksena nollanäytteitä. Mittaustulokset tallennetaan sopivassa sähköisessä muodossa myöhempää analysointia varten.

2. MITTAUSTULOKSET

2.1 MITTAUSTULOSTEN LAATU JA MÄÄRÄ

Mittaustulosten avulla pitäisi voida analysoida järkevästi säteilytyksellä ja ilman sitä saadut pitoisuusvasteet sekä mahdollisuuksien mukaan se testikemikaalin pitoisuus, jossa solujen elävyys on vähentynyt 50 prosenttiin (IC50). Jos havaitaan sytotoksisuutta, sekä pitoisuusalue että yksittäiset pitoisuudet on valittava siten, että koetuloksiin voidaan sovittaa kuvaaja.

Selvästi positiivisia tai selvästi negatiivisia tuloksia ei tarvitse tarkistaa toistamalla koetta (katso kohta 2.3, ensimmäinen alakohta). Tällaisissa tapauksissa riittää yksi koe, jota tukee yksi tai useampia annoksen pitoisuusaluetta määrittäviä alustavia kokeita.

▼B

Moniselitteiset tai epäselvät tulokset tai rajatapaukset olisi selvennettävä uudella testillä (katso kohdan 2.4 toinen alakohta). Tällaisissa tapauksissa olisi harkittava koeolosuhteiden muuttamista. Voidaan muuttaa pitoisuusalue tai pitoisuuksien välit, esi-inkubaatioaika ja altistusaika säteilytykselle. Vedessä hajoaville kemikaaleille voi lyhyt altistusaika olla tarkoituksenmukainen.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI

Tulosten arvioimiseksi voidaan laskea valoärsyttävyystekijä (PIF) tai keskimääräinen valovaikutus (MPE).

Valomyrkyllisyyden arvojen laskemiseksi (ks. jäljempänä) on yksittäisiä konsentraatio-vastearvoja aproksimoitava jatkuvalla konsentraatio-vastekuvaajalla (malli). Kuvaaja sovitetaan tuloksiin tavallisesti soveltamalla ei-lineaarista regressiomenetelmää (18). Jotta voidaan arvioida tietojen vaihtelevuuden vaikutus kuvaajaan, suositellaan bootstrap-menetelmää.

Valoärsyttävyystekijä (PIF) lasketaan seuraavasta kaavasta:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Jos IC_{50}:tä (joko valon kanssa tai ilman valoa) ei voida laskea, PIF:iä ei voida määrittää testiaineelle. Keskimääräinen valovaikutus (MPE) perustuu täydellisten pitoisuus-vastekuvaajien vertailuun (19). Se määritellään edustavien valovaikutusarvojen painotetuksi keskiarvoksi.

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Valovaikutus PE_c missä tahansa pitoisuudessa C määritellään vastevaikutuksen RE_c ja annosvaikutuksen DE_c tulona PE_c = RE_c x DE_c. Vastevaikutus RE_c on ilman valoa ja valon kanssa havaittujen vasteiden erotus RE_c = R_c (- Irr) - R_c (+ Irr). Annosvaikutus lasketaan kaavasta

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

jossa C* on ekvivalenssipitoisuus eli pitoisuus, jossa + Irr-vaste vastaa - Irr-vastetta pitoisuudessa C. Jos C*:tä ei voida määrittää, koska + Irr-kuvaajan vastearvot ovat järjestelmällisesti suurempia tai pienempiä kuin R_C (- Irr), annosvaikutuksen arvo on 1. Painotuskertoimet (WI) saadaan suurimmasta vastearvosta: w_i = MAX {Ri (+ Irr), Ri (- Irr)}. Pitoisuusvälit Ci valitaan siten, että kuhunkin pitoisuusväliin kuuluu sama määrä pisteitä. MPE:n laskeminen rajoittuu siihen suurimpaan pitoisuusarvoon, jossa ainakin toinen kuvaajista edelleen antaa vähintään 10 prosentin vastearvon. Jos tämä suurin pitoisuus on suurempi kuin + Irr-kokeessa käytetty suurin pitoisuus, + Irr-kuvaajan jäljelle jäävässä osassa vastearvo on 0. Riippuen siitä, onko MPE:n arvo suurempi kuin asianmukaisesti valittu erotteleva raja-arvo (MPE_c=0,15) vai ei, kemikaali luokitellaan valomyrkylliseksi.

▼B

PIF:n ja MPE:n laskemista varten on saatavissa ohjelmistopaketti (20).

2.3 TULOSTEN TULKINTA

Validointitutkimuksen perusteella (8) testiaineen, jonka PIF < 2 tai MPE < 0,1 ennuste on: ”ei valomyrkyllinen”. Kun PIF > 2 ja < 5, tai kun MPE > 0,1 ja < 0,15, ennuste on: ”todennäköisesti valomyrkyllinen”; kun PIF > 5, tai kun MPE > 0,15, ennuste on: ”valomyrkyllinen”.

Laboratorion, joka ottaa käyttöön tämän määrityksen, olisi testattava ensin taulukossa 1 mainitut vertailumateriaalit ennen kuin aloitetaan testinaineiden testaaminen valomyrkyllisyyden arvioimiseksi. PIF- ja MPE-arvojen tulisi olla lähellä taulukossa 1 mainittuja arvoja.

Taulukko 1

Kemiallinen nimi	EINECS nro	CAS nro	PIF	MPE	Absorptio-huippu	Liuotin (1)
Amiodaroni-HCL	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (olkapää)	ethanoli
Klooripromatsiini-HCL	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33-0,63	309 nm	ethanoli
Norfloksasiini	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34-0,90	316 nm	asetonitriili
Antraseeni	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19-0,81	356 nm	asetonitriili
Protoporfyriini IX, dinatrium	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54-0,74	402 nm	ethanoli
L-histidiini		[7006-35-1]	ei PIF-arvoa	0,05-0,10	211 nm	vesi
Heksaklorofeeni	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317nm (olkapää)	ethanoli
Natriumlauryylisulfaatti	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	Ei absorptiota	vesi

(1) Absorption määritykseen käytetty liuotin.

2.4 TULOSTEN TULKINTA

Jos valomyrkyllisyysvaikutuksia havaitaan vain suurimmilla testipitoisuuksilla (erityisesti vesiliukoisilla testikemikaaleilla), vaaran arvioimiseksi voidaan tarvita lisätestaamista muilla pitoisuuksilla. Lisätietoja voidaan tarvita esimerkiksi kemikaalin imeytymisestä ja kertymisestä ihoon, ja/tai kemikaali on testattava muulla testillä, esimerkiksi ihmisen tai eläimen ihoa käyttävällä *in vitro* -testillä tai ihomallien avulla.

▼B

Jos myrkyllisyyttä ei voida osoittaa (+ Irr ja - Irr) ja jos aineen huonoliukoisuus rajoittaa testattavia pitoisuuksia, voidaan asettaa kyseenalaiseksi, sopiiko testiaine kyseiseen määritykseen, ja on harkittava vahvistavaa määritystä (esim. käyttämällä muuta mallia).

3. **RAPORTOINTI**

TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä vähintään seuraavat tiedot:

Testiaine:

— tunnistetiedot, yleisnimet ja IUPAC- ja CAS-numero, jos se tiedetään,

— fysikaalinen olomuoto ja puhtaus,

— fysikokemialliset ominaisuudet, jotka vaikuttavat tutkimuksen tekemiseen,

— UV-valon ja näkyvän valon absorptiospektri,

— stabiilius ja valostabiilius, jos tunnetaan.

Liuotin:

— perustelut liuottimen valinnalle,

— testikemikaalin liukoisuus liuottimeen,

— liuottimen pitoisuus prosentteina käsittelynesteessä.

Solut:

— solujen tyyppi ja lähde,

— onko soluissa mykoplasmaa,

— solujen siirrostusjärjestysluku, jos se tiedetään,

— solujen säteilyherkkyys määritettynä sillä säteilytyslaitteella, jota käytetään *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä.

Testiolosuhteet (1) — *inkubointi ennen käsittelyä ja sen jälkeen:*

— viljelynesteen tyyppi ja koostumus,

— inkubaatio-olosuhteet (CO_2-pitoisuus, lämpötila, kosteus),

— inkubaatioaika (esikäsittely, jälkikäsittely).

Testiolosuhteet (2) — *käsittely kemikaalilla:*

— perustelut testikemikaalin pitoisuuksien valintaan (sekä säteilytyksen kanssa että ilman sitä),

— jos testikemikaali on huonoliukoinen eikä osoita solumyrkyllisyyttä, perustelut suurimmalle testatulle pitoisuudelle,

— käsittelynesteen tyyppi ja koostumus (puskuroitu suolaliuos),

— kemikaalikäsittelyn kesto.

Testiolosuhteet (3) — *säteilytys:*

— perustelut käytetyn valolähteen valinnalle,

▼B

— valolähteen ja säteilymittarin valmistaja ja tyyppi,

— valolähteen spektrin säteilyominaisuudet,

— käytetyn suodattimen (käytettyjen suodattimien) transmissio- ja absorptio-ominaisuudet,

— säteilymittarin ominaisuudet ja sen kalibrointi yksityiskohtaisesti,

— valolähteen etäisyys testijärjestelmästä,

— UVA-säteilyn voimakkuus kyseisellä etäisyydellä, mW/cm^2,

— UV-altistuksen tai näkyvälle valolle altistuksen kesto,

— UVA-annos (säteilyvoimakkuus × aika), ilmaistuna laatuna J/cm^2,

— soluviljelmien lämpötila säteilytyksen aikana ja samanaikaisesti pimeässä pidettyjen soluviljelmien lämpötila.

Testiolosuhteet (4) — *neutraalipunatesti:*

— neutraalipunaliuoksen koostumus,

— neutraalipunainkubaation kesto,

— inkubaatio-olosuhteet (CO2-pitoisuus, lämpötila, kosteus),

— neutraalipunan uutto-olosuhteet (uuttoaine, kesto),

— aallonpituus, jolla neutraalipunan optinen tiheys luettiin spektrofotometrillä,

— toinen (vertailu-) aallonpituus, jos sellaista käytettiin,

— spektrofotometrin mahdollisen nollaliuoksen sisältö.

Tulokset:

— solujen elävyys kullakin testikemikaalin pitoisuudella ilmaistuna prosentteina rinnakkaisten liuotinkontrollien keskimääräisestä elävyydestä,

— pitoisuus-vastekuvaajat (testikemikaalin pitoisuus vs. suhteellinen solujen elävyys), joka on saatu samanaikaisesti tehdyissä (+ Irr)- ja (- Irr)-kokeissa,

— pitoisuus-vastekuvaajien analyysi; jos mahdollista, lasketaan IC_{50} (+ Irr) ja IC_{50} (- Irr),

— niiden kahden konsentraatio-vastekuvaajan vertailu, jotka on saatu säteilytyksen kanssa ja ilman sitä, joko laskemalla valoärsyttävyystekijä (PIF) tai laskemalla keskimääräinen valovaikutus (MPE),

— testin hyväksyttävyyskriteerit; samanaikainen liuotinkontrolli:

— säteilytettyjen ja säteilyttämättömien solujen absoluuttinen elävyys (neutraalipunauutteen optinen tiheys),

— negatiivista ja liuotinkontrollia koskevat aiemmat tiedot; keskiarvot ja vakiopoikkeamat,

— –testin hyväksyttävyyskriteerit; samanaikainen positiivinen kontrolli:

▼B

— positiivisen kontrollikemikaalin IC_{50}(+ Irr) ja IC_{50}(- Irr) ja PIF/-MPE;

— positiivista kontrollia koskevat aiemmat kemialliset tiedot: IC_{50}(+ Irr) ja IC_{50}(- Irr) ja PIF/MPE; keskiarvot ja vakiopoikkeamat.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95–102.

2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI–XXXV.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314–348.

4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79–110.

5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 "Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Paris.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793–796.

7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7–8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305–327.

9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119–124.

11. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225–237.

▼B

12. Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In ”Dermatotoxicology”, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515–530.

13. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825–1829.

14. ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union Directive 76/768/EEC, in the in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679–708.

18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127–138.

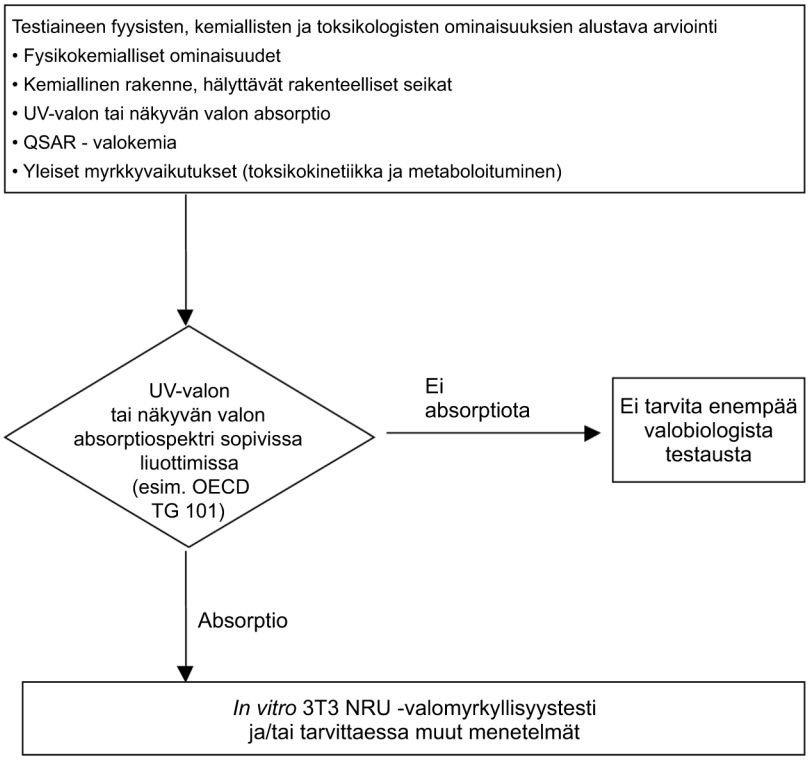
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445–462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1, 00.html

▼B

LIITE 1

3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin asema kemikaalien valomyrkyllisyyden vaiheittaisessa määrittämisessä

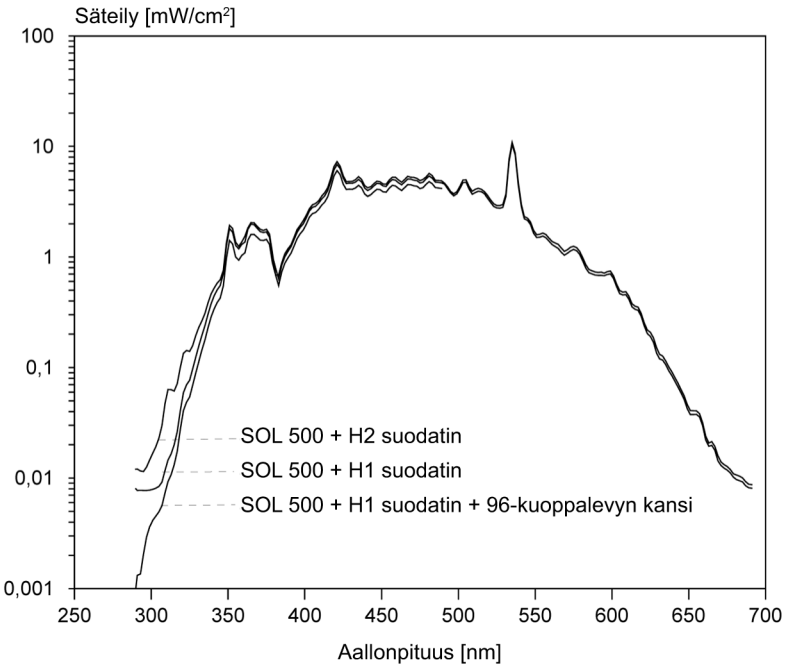


▼B

LIITE 2

Kuva 1

Suodatetun auringonvalosimulaattorin valon spektritehojakauma



(katso kohdan 1.4.1.5 toinen alakohta)

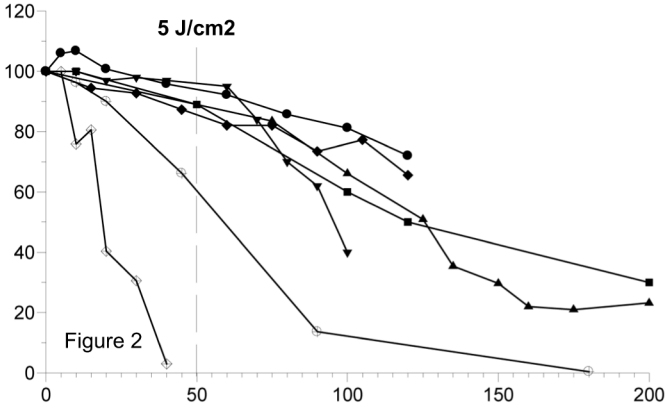
Kuvassa 1 oleva kaavio on esimerkki hyväksyttävästä suodatetun auringonvalosimulaattorin spektrin säteilyvoimakkuusjakaumasta. Kyseessä on (seostettu) metallihalidikaarilamppu, jota käytettiin 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin validointikokeessa (6) (8) (17). Kaaviosta käy ilmi kahden eri suodattimen suodatinvaikutus sekä soluviljelmien 96-kuoppalevyn kannen lisäsuodatinvaikutus. H2-suodatinta käytettiin vain testijärjestelmissä, jota sietävät suurempia määriä UVB-säteilyä (ihomallitesti ja punaisten verisolujen fotohemolyysitesti). 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä käytettiin H1-suodatinta. Kaaviosta käy ilmi, että kuoppalevyn kannen lisäsuodatinvaikutus todetaan pääasiallisesti UVB-alueella. Suodatinvaikutus jättää säteilyspektriin tarpeeksi UVB-säteilyä, jotta voidaan eksitoida kemikaaleja, jotka absorboivat säteilyä tyypillisesti UVB-alueella (esim. amiodaroni) (katso taulukko 1).

▼B

Kuva 2

Balb/c 3T3 -solujen säteilyherkkyys (mitattuna UVA-alueella)

Solujen elävyys (neutraalipunan otto prosentteina pimeässä pidettyjen kontrollien neutraalipunan otosta)



Säteilytyksen kesto(min)

(10 min = 1 joule UVA/cm²)

(katso kohdan 1.4.1.5.2 toinen alakohta sekä kohdat 1.4.2.2.1 ja 1.4.2.2.2)

Kaavio kuvaa Balb/c 3T3 -solujen herkkyyttä 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin validointikokeessa käytetyn auringonvalosimulaattorin valolle (mitattuna UVA-alueella). Kuvaajasta näkyvät validointia edeltäneessä tutkimuksessa (seitsemässä eri laboratoriossa) saadut tulokset (1). Valkoisilla symboleilla merkityt kaksi kuvaajaa saatiin vanhoilla soluilla (paljon siirrostamisia), jotka oli korvattava uusilla soluilla. Mustilla symboleilla merkityt kuvaajat saatiin soluilla, joiden säteilyherkkyys oli hyväksyttävä.

Näistä tiedoista johdettiin suurimmaksi ei-solumyrkylliseksi säteilytysannokseksi 5 J/cm^2 (pystysuora katkoviiva). Vaakasuora katkoviiva osoittaa lisäksi suurimman hyväksyttävän säteilyvaikutuksen (katso kohta 1.4.2.2.).

▼M3

B.42. **IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYS-MENETELMÄ**

JOHDANTO

1. Kemikaalien testausta koskevia OECD:n ohjeita ja niihin perustuvia EU:n testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvointiin liittyvien kysymysten perusteella. Hiirten ihoherkistyksen määrittämisessä käytettävä alkuperäinen testimenetelmä, paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä (Local Lymph Node Assay, LLNA; OECD:n testiohje 429; tämän liitteen B.42 luku), on hyväksytty aiemmin (1). LLNA-menetelmän validointia koskevat yksityiskohtaiset tiedot ja siihen liittyvien tehtävien arviointi on julkaistu (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Ajan tasalle saatettu LLNA perustuu kokemusten ja tieteellisten tietojen arviointiin (12). Tämä on toinen menetelmä kemikaalien (aineiden ja seosten) ihoherkistyspotentiaalin arvioimiseksi eläimillä. Toisessa testimenetelmässä (OECD:n testiohje 406; tämän liitteen B.6 luku) käytetään marsutestejä, erityisesti marsuilla tehtävää maksimointitestiä ja Bühlerin testiä (13). LLNA-menetelmä on B.6 menetelmään ja OECD:n testiohjeeseen 406 (13) verrattuna edistyneempi eläinten hyvinvoinnin kannalta. Tässä ajan tasalle saatetussa LLNA-testimenetelmässä esitetään suoritusvaatimuksia (lisäys 1), joiden avulla LLNA-menetelmää toiminnallisesti ja mekaanisesti vastaavien uusien ja/tai mukautettujen testimenetelmien validoinnin tila voidaan arvioida OECD:n ohjeasiakirjan nro 34 (14) periaatteiden mukaisesti.

2. LLNA-menetelmällä tutkitaan ihoherkistyksen induktiovaihetta ja tuotetaan annosvasteen arviointiin sopivia kvantitatiivisia tuloksia. On syytä huomata, että lievää tai keskimääräistä herkistystä aiheuttavia aineita, joita suositellaan positiivisiksi kontrollikemikaaleiksi marsutestimenetelmissä (B.6; OECD:n testiohje 406) (13), voidaan käyttää myös LLNA-menetelmässä (6) (8) (15). Myös koe-eläinten vähäisempään käyttöön perustuva LLNA-menetelmän muunnos (rLLNA-menetelmä), jossa eläimiä käytetään jopa 40 prosenttia vähemmän, kuvataan vaihtoehtona tässä testimenetelmässä (16) (17) (18). rLLNA-menetelmää voidaan käyttää, jos ihoherkistyspotentiaalin ennakoitu negatiivinen löydös on sääntelysyistä vahvistettava, edellyttäen että kaikkia muita tässä testimenetelmässä kuvattuja LLNA-menettelyn vaatimuksia noudatetaan. Negatiivisen löydöksen oletuksen on perustuttava kaikkiin 4 kohdassa tarkoitettuihin saatavilla oleviin tietoihin. Ennen rLLNA-menetelmän käyttöä on sille esitettävä selvät perustelut ja tieteelliset perusteet. Jos rLLNA-menetelmällä saadaan odotusten vastaisesti positiivinen tai epäselvä tulos, löydöksen tulkitsemiseksi tai selventämiseksi voidaan tarvita täydentäviä testejä. Tätä rLLNA-menetelmää ei saa käyttää ihoherkistystesteissä käytettävien aineiden vaarallisuuden määrittämiseksi siinä tapauksessa, että vaaditaan annos-vastetietoja, kuten aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 ja Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmässä (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) määritettyä alaluokitusta.

MÄÄRITELMÄT

3. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 2.

JOHDANTO JA RAJOITUKSET

4. LLNA on vaihtoehtoinen menetelmä ihoa herkistävien kemikaalien tunnistamiseksi. Tämä ei välttämättä merkitse sitä, että LLNA-menetelmää pitäisi käyttää kaikissa tapauksissa marsutestin asemesta (B.6; OECD:n testiohje 406) (13), vaan pikemminkin sitä, että menetelmä on yhtä hyvä ja sitä voidaan käyttää vaihtoehtona, jossa positiivisia ja negatiivisia tuloksia ei yleensä enää tarvitse varmistaa uudelleen. Testilaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen tekemistä. Tällaisia tietoja ovat muun muassa testiaineen tunnistetiedot ja

▼M3

kemiallinen rakenne, sen fysikaaliskemialliset ominaisuudet, muiden testiaineella tehtyjen *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien tulokset sekä rakenteellisesti samankaltaisten kemikaalien toksikologiset tiedot. Tietojen perusteella on määritettävä, voidaanko LLNA-menetelmää käyttää kyseisen aineen testaamiseen (ottaen huomioon, että LLNA-menetelmä ei sovellu tiettyjen kemikaalityyppien testaamiseen – katso 1 kohta) ja mitä annosta on käytettävä.

5. LLNA on *in vivo* -menetelmä, joten sitä käytettäessä ei lopeteta koe-eläinten käyttöä kosketusherkistyksen arvioinnissa. Sitä käytettäessä voidaan kuitenkin vähentää tähän tarkoitukseen tarvittavien eläinten määrää. LLNA-menetelmässä käytetty tapa testata kosketusherkistystä eläimillä on myös huomattavasti aikaisempia edistyneempi (vähemmän kipua ja kärsimystä). LLNA-menetelmän perustana on kemikaalien aiheuttamien immunologisten tapahtumien tarkastelu ihoherkistyksen induktiovaiheen aikana. Marsutesteistä (B.6; OECD:n testiohje 406) (13) poiketen LLNA-menetelmässä ei edellytetä tarkoituksellista ihon yliherkkyysreaktioiden tuottamista. LLNA-menetelmä ei myöskään edellytä adjuvantin käyttöä, toisin kuin marsuilla tehtävä maksimointitesti (13). Lena-menetelmään siis liittyy vähemmän eläinten kipua ja kärsimystä. Vaikka LLNA-menetelmä onkin B.6 menetelmään ja OECD:n testiohjeeseen 406 verrattuna edistyneempi, on syytä huomata, että siihen liittyy tiettyjä rajoituksia, joiden vuoksi voi olla tarpeen käyttää B.6 menetelmää tai OECD:n testiohjetta 406 (13) (väärät negatiiviset löydökset LLNA-menetelmällä joidenkin metallien osalta, väärät positiiviset löydökset joidenkin ihoa ärsyttävien aineiden, esimerkiksi pinta-aktiivisten kemikaalien, osalta (19) (20) tai testiaineen liukoisuus). Määritystä häiritseviä (21) funktionaalisia ryhmiä sisältävien kemikaaliluokkien tai aineiden yhteydessä voi olla tarpeen käyttää marsutestejä (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (13). Pääasiassa torjunta-aineformulaatioita sisältävän suppean validointitietokannan perusteella LLNA-menetelmällä saadaan tämäntyyppisistä testiaineista (22) marsutestiä todennäköisemmin positiivinen tulos. Formulaatioita testattaessa on kuitenkin tarvittaessa otettava vertailuaineeksi tunnettuja tuloksia antavia aineita sen osoittamiseksi, että LLNA-menetelmä toimii asianmukaisesti (katso 16 kohta). Tällaisia tunnettuja rajoituksia lukuun ottamatta LLNA-menetelmällä olisi pystyttävä testaamaan mitä tahansa ainetta, elleivät kyseisten aineiden ominaisuudet vaikuta LLNA-menetelmän tarkkuuteen.

TESTIN PERIAATE

6. LLNA-menetelmän perusperiaate on, että ihoa herkistävät aineet aiheuttavat lymfosyyttien proliferaatiota imusolmukkeissa, jotka dreneeraavat alueen, jonne testiaine on annosteltu. Tämä proliferaatio on suhteessa allergeenin annokseen ja potenssiin ja tarjoaa yksinkertaisen keinon ihoherkistyksen mittaamiseksi kvantitatiivisella tavalla. Proliferaatio mitataan vertaamalla kussakin testiryhmässä tapahtuvaa keskimääräistä proliferaatiota kantaja-aineella käsitellyssä kontrolliryhmässä tapahtuvaan keskimääräiseen proliferaatioon. Kunkin käsitellyn ryhmän keskimääräisen proliferaation ja sitä vastaavan kantaja-aineella käsitellyn ryhmän keskimääräisen proliferaation suhde (stimulaatioindeksi, SI) määritetään, ja sen on oltava vähintään 3, ennen kuin testiaine voidaan arvioida mahdollisesti ihoherkistystä aiheuttavaksi. Tässä kuvatut menetelmät perustuvat korvalehden dreneeraavien imusolmukkeiden solujen proliferaation mittaamiseen radioaktiivisen *in vivo* -merkkiaineen avulla. Solujen proliferaation arvioimiseksi voidaan kuitenkin käyttää myös muita päätepisteitä edellyttäen, että suoritusvaatimukset täytetään (lisäys 1).

▼M3

MÄÄRITYSMENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

7. Paras eläinlaji tähän testiin on hiiri. Testissä käytetään nuoria täysikasvuisia CBA/Ca- tai CBA/J-kannan naarashiiriä, jotka eivät ole synnyttäneet eivätkä ole raskaana. Testin alussa eläinten on oltava 8–12 viikon ikäisiä, ja eläinten painoerojen on oltava vähäisiä eli enintään 20 prosenttia keskipainosta. Muita kantoja tai uroseläimiä voidaan käyttää, jos tietoja tuotetaan riittävästi sen osoittamiseksi, että LLNA-vasteessa ei esiinny merkitseviä koe-eläinkantaan tai sukupuoleen liittyviä eroja.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

8. Hiiret on pidettävä samoissa häkeissä (23), ellei hiirien pitämiselle erillisissä häkeissä esitetä riittäviä tieteellisiä perusteluja. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 celsiusastetta. Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70 prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, on kuitenkin pyrittävä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa on käytettävä keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Eläinten valmistelu

9. Eläimet valitaan satunnaistetusti, merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan (ei kuitenkaan korvamerkeillä), ja pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testiaineen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Ennen käsittelyn alkua kaikki eläimet on tutkittava sen varmistamiseksi, ettei niillä ole havaittavia ihovaurioita.

Annosteluliuosten valmistelu

10. Kiinteät kemikaalit on liuotettava tai sekoitettava liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja tarvittaessa laimennettava ennen niiden annostelua hiiren korvaan. Nestemäiset kemikaalit voidaan annostella laimentamattomana tai ennen annostelua laimennettuina. Vaikealiukoisia kemikaaleja, kuten sellaisia, joita käytetään yleisesti lääkinnällisissä laitteissa, olisi uutettava erityisen voimakkaasti asianmukaisessa liuottimessa, jotta saataisiin testausta varten esiin kaikki uuttuvat ainesosat ennen annostelua hiirten korviin. Testiaineet on valmistettava päivittäin, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

Testin luotettavuuden tarkistus

11. Määritysmenetelmän toimivuus osoitetaan positiivisten kontrollikemikaalien avulla. Niillä on testissä saatava aikaan riittävä ja toistettavissa oleva herkistyminen, ja vasteen voimakkuuden on oltava aineelle tyypillinen. Positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä samanaikaisesti suositellaan, koska sillä osoitetaan, että laboratoriolla on riittävä pätevyys kunkin määritysmenetelmän toteuttamiseksi, ja sen avulla voidaan arvioida laboratorioiden sisäistä ja laboratorioiden välistä uusittavuutta ja vertailtavuutta. Myös tietyt sääntelyviranomaiset vaativat positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä jokaisessa määrityksessä, ja käyttäjiä kehotetaankin ottamaan yhteyttä asiasta vastaaviin viranomaisiin ennen LLNA-menetelmän toteuttamista. Tämän takia suositellaan, että positiivista kontrollikemikaalia käytetään säännönmukaisesti kaikissa määrityksissä, jotta positiivisen kontrollikemikaalin satunnaisesta käytöstä mahdollisesti johtuvien vaatimusten täyttämiseksi ei tarvitsisi

▼M3

tehdä uusia eläinkokeita (katso 9 kohta). Positiivisen kontrollikemikaalin on tuotettava positiivinen LLNA-vaste altistustasolla, jonka odotetaan antavan stimulaatioindeksin (SI), joka on suurempi kuin 3, negatiiviseen kontrolliryhmään verrattuna. Positiivisen kontrollikemikaalin annostaso on valittava siten, että se ei aiheuta liian voimakasta ihoärsytystä tai koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja että induktio on toistettavissa mutta ei liian suuri (esimerkiksi SI > 20 on liian suuri). Suositeltavia positiivisia kontrollikemikaaleja ovat 25-prosenttinen heksyylikanelialdehydi (CAS-numero 101-86-0) asetonin ja oliiviöljyn seoksessa (4:1 v/v) ja 5-prosenttinen merkaptobentsotiatsoli (CAS-numero 149-30-4) *N,N*-dimetyyliformamidissä (katso lisäyksen 1 taulukko 1). Joissakin olosuhteissa voidaan riittävin perustein käyttää muita positiivisia kontrollikemikaaleja, jotka täyttävät edellä mainitut kriteerit.

12. Vaikka positiivisen kontrolliryhmän käyttöä suositellaan aina, joissakin tapauksissa positiivisen kontrollikemikaalin testaus vain ajoittain (enintään kuuden kuukauden välein) voi riittää LLNA-menetelmää säännöllisesti käyttävissä laboratorioissa (eli sellaisissa, jotka tekevät LLNA-määritystä vähintään kerran kuukaudessa) ja joilla on aiempia positiivisen kontrollikemikaalin määritystietoja, jotka osoittavat laboratorion valmiuden saada aikaan uusittavissa olevia ja täsmällisiä tuloksia positiivisilla kontrollikemikaaleilla. Riittävä LLNA-menetelmää koskeva pätevyys voidaan osoittaa tuottamalla positiivisella kontrollikemikaalilla toistuvasti samantasoisia positiivisia tuloksia vähintään kymmenessä riippumattomassa testissä kohtuullisen ajan kuluessa (alle yhden vuoden aikana).

13. Samaan aikaan tehtyä positiivista kontrollikemikaalia on käytettävä aina, kun LLNA-menetelmää muutetaan (esimerkiksi kun koulutettu henkilökunta vaihtuu, testimenetelmän materiaalit ja/tai reagenssit vaihtuvat, testimenetelmässä käytettävät laitteet vaihtuvat tai koe-eläinten alkuperä vaihtuu), ja tällaiset muutokset on kirjattava laboratorioraportteihin. Muutosten vaikutusta aiempien määritystietojen asianmukaisuuteen on tarkasteltava päätettäessä, onko uusien määritystietojen kerääminen tarpeen positiivisen kontrollikemikaalin tulosten yhdenmukaisuuden osoittamiseksi.

14. Tutkijoiden on otettava huomioon, että jos positiivista kontrollikemikaalia ei määritetä joka kerralla vaan vain silloin tällöin, saattaa negatiivisten tutkimustulosten asianmukaisuus ja hyväksyttävyys vaarantua, kun ajoittain tehtyjen positiivisen kontrollikemikaalin määritysten välillä ei tehdä positiivisen kontrollikemikaalin määritystä samanaikaisesti. Jos esimerkiksi ajoittaisesta positiivisen kontrollikemikaalin määrityksestä saadaan väärä negatiivinen tulos, positiivisen kontrollikemikaalin viimeisen hyväksytyn ajoittaisen määrityksen ja positiivisen kontrollikemikaalin hylätyn ajoittaisen määrityksen tuloksen välisenä aikana saadut testiaineen negatiiviset tulokset voivat olla kyseenalaisia. Näiden tulosten seurauksia on tarkasteltava huolellisesti päätettäessä positiivisten kontrollikemikaalien käyttämisestä testiaineen rinnalla tai vain ajoittain. Lisäksi olisi harkittava, että testiaineen rinnalla käytettävää positiivista kontrolliryhmää varten käytettäisiin vähemmän eläimiä, jos se on tieteellisesti perusteltua ja jos laboratorio osoittaa laboratoriokohtaisten aiempien tietojen perusteella, että käytettävien hiirten määrää voidaan vähentää (12).

15. Vaikka positiiviset kontrollikemikaalit on testattava kantaja-aineessa, jonka tiedetään antavan aina samanlaisen vasteen (esimerkiksi asetoni:oliiviöljy, 4:1 v/v), joissakin tapauksissa testaus saattaa sääntelysyistä olla tarpeen myös muussa kuin standardikantaja-aineessa (kliinisesti/kemiallisesti relevantissa aineessa) (24). Jos samanaikaisesti määritettävää positiivista kontrollikemikaalia testataan eri kantaja-aineessa kuin testiainetta, on sitä varten käytettävä erillistä kantaja-aineella käsiteltyä positiivista kontrollia.

16. Arvioitaessa tiettyyn kemikaaliluokkaan kuuluvia tai tietyn vastetason aikaansaavia testiaineita voidaan myös käyttää vertailuaineita sen osoittamiseksi, että testimenetelmällä voidaan asianmukaisesti havaita tämäntyyppisten testiaineiden ihoherkistyspotentiaali. Vertailuaineilla olisi oltava seuraavat ominaisuudet:

— rakenteellinen ja funktionaalinen vastaavuus testattavana olevaan testiaineluokkaan verrattuna

— tunnetut fyysiset/kemialliset ominaisuudet

— sopivuutta tukevia LLNA-menetelmästä saatuja tietoja

— sopivuutta tukevia muista eläinmalleista ja/tai ihmisistä saatuja tietoja.

▼M3

TESTIMENETTELY

Koe-eläinten määrä ja annostasot

17. Kussakin annostasoryhmässä on oltava vähintään neljä eläintä, ja testiaineesta on käytettävä vähintään kolmea konsentraatiota; lisäksi käytetään aina negatiivista kontrolliryhmää, joka käsitellään vain testiaineen kantaja-aineella, sekä positiivista kontrolliryhmää (jota käytetään aina tai jota on käytetty hiljattain, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–14 kohdat). Positiivisesta kontrolliryhmästä on tarvittaessa testattava useita annoksia, etenkin jos positiivista kontrollikemikaalia testataan epäsäännöllisesti. Kontrolliryhmän eläimiä on kohdeltava samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä, paitsi että niitä ei käsitellä testiaineella.

18. Annostason ja kantaja-aineen valinnan on perustuttava lähteissä (3) ja (5) esitettyihin suosituksiin. Yleensä valitaan sopivasta konsentraatiosarjasta, esimerkiksi sarjasta 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. peräkkäisiä konsentraatioita. Käytettävälle konsentraatiosarjalle on esitettävä asianmukaiset tieteelliset perustelut. Kaikki käytettävissä olevat toksikologiset tiedot (esimerkiksi akuutti toksisuus ja ihoärsytys) ja rakenteelliset ja fysikaaliskemialliset tiedot kyseisestä testiaineesta (ja/tai rakenteellisesti vastaavista aineista) on tarvittaessa otettava huomioon kolmen peräkkäisen konsentraation valinnassa siten, että suurin konsentraatio edustaa maksimialtistusta, mutta kuitenkin niin, että vältetään koko elimistöön kohdistuva toksisuus ja/tai liian voimakas paikallinen ihoärsytys (3) (25). Jos tällaisia tietoja ei ole käytettävissä, voi olla tarpeen tehdä alustava kartoitustesti (katso 21–24 kohta).

19. Kantaja-aine ei saa vaikuttaa testituloksiin tai vääristää niitä, ja se on valittava siten, että testiaineen annosteluun sopivan liuoksen/suspension aikaan saannissa varmistetaan suurin mahdollinen liukoisuus ja konsentraatio. Suositeltavia kantaja-aineita ovat asetoni:oliiviöljy (4:1 v/v), *N,N*-dimetyyliformamidi, metyylietyyliketoni, propyleeniglykoli ja dimetyylisulfoksidi (19), mutta muitakin kantaja-aineita voidaan käyttää riittävin tieteellisin perustein. Joissakin tilanteissa voi olla tarpeen käyttää lisäkontrolliaineena kliinisesti perusteltua liuotinta tai sitä kaupallista valmistetta, jona testiainetta markkinoidaan. Erityisesti on varmistettava, että hydrofiiliset testiaineet sisällytetään sellaiseen kantaja-ainejärjestelmään, joka vettää ihon eikä valu heti pois, lisäämällä asianmukaisia liukenemista edistäviä aineita (esimerkiksi 1-prosenttinen Pluronic® L92). On siis syytä välttää kantaja-aineina pelkkiä vesiliuoksia.

20. Yksittäisten hiirten imusolmukkeita prosessoimalla voidaan arvioida eläintenvälistä vaihtelua ja vertailla tilastollisesti testiaineella ja kantaja-aineella käsiteltyjen ryhmien tuloksia (katso 35 kohta). Myös positiivisen kontrolliryhmän hiirten määrän vähentämisen arviointi on mahdollista, kun tietoja kerätään yksittäisistä eläimistä (12). Tietyt sääntelyviranomaiset vaativat, että tietoja on kerättävä yksittäisistä eläimistä. Jotkut sääntelyviranomaiset kuitenkin hyväksyvät useista eläimistä yhdistettyjä tietoja, ja tällaisissa tilanteissa käyttäjät voivat kerätä tietoja joko yksittäisistä eläimistä tai eläinryhmistä.

Varsinaista testiä edeltävä kartoitustesti

21. Jos suurimman testattavan annoksen määrittämiseksi ei ole saatavilla tietoja (katso 18 kohta), on kartoitettava esitestillä, mikä olisi LLNA-menetelmän testeissä käytettävä asianmukainen annostaso. Kartoitustesti helpottaa enimmäisannoksen tason valinnassa varsinaista LLNA-tutkimusta varten, kun tietoja koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden (katso 24 kohta) ja/tai liian voimakkaan paikallisen ihoärsytyksen (katso 23 kohta) aiheuttavasta konsentraatiosta ei ole saatavilla. Testattavan enimmäisannoksen tason on vastattava sataa prosenttia nestemäisen testiaineen osalta tai suurinta mahdollista konsentraatiota kiinteiden tai suspendoitujen aineiden osalta.

▼M3

22. Kartoitustesti suoritetaan varsinaista LLNA-tutkimusta vastaavissa olosuhteissa, kuitenkin niin, että imusolmukkeiden proliferaatiota ei arvioida ja kussakin annosryhmässä voidaan käyttää vähemmän eläimiä. Kussakin annosryhmässä olisi hyvä käyttää yhtä tai kahta eläintä. Kaikkia hiiriä tarkkaillaan päivittäin koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden tai applikaatiokohdassa esiintyvän paikallisen ärsytyksen kliinisten merkkien havaitsemiseksi. Eläinten paino kirjataan ennen testaamista ja ennen eläinten lopettamista (päivä 6). Kunkin hiiren molemmista korvista tutkitaan eryteeman merkit, ja ne pisteytetään taulukon 1 mukaisesti (25). Korvan paksuus mitataan paksuusmittarilla (esimerkiksi digitaalisella mikrometrillä tai Peacock Dial -paksuusmittarilla) päivänä 1 (ennen annosta), päivänä 3 (noin 48 tunnin kuluttua ensimmäisestä annoksesta) ja päivänä 6. Päivänä 6 korvan paksuus voidaan myös määrittää mittaamalla korvan lävistämiseen tarvittava massa sen jälkeen, kun eläimet on lopetettu humaanisti. Jos eryteema on erittäin voimakas ja/tai korvan paksuus on kasvanut vähintään 25 prosenttia minä tahansa mittauspäivänä, paikallinen ihoärsytys pisteytetään arvolla ≥ 3 (26) (27). Suurin varsinaiseen LLNA-tutkimukseen valittava annos on testiä edeltävän konsentraatiosarjan (katso 18 kohta) suurin annos, joka ei enää aiheuta koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä.

Taulukko 1

Eryteemapisteytys

Havainto	Pisteet
Ei eryteemaa	0
Hyvin lievä eryteema (tuskin havaittava)	1
Selkeästi erottuva eryteema	2
Keskivakava–vakava eryteema	3
Vakava eryteema (voimakas punoitus)–karsta, joka estää eryteeman pisteytyksen	4

23. Käsiteltyjen hiirten korvien paksuuden tilastollisesti merkittävää yli 25 prosentin kasvua (26) (27) kontrollihiiriin verrattuna on käytetty myös LLNA-menetelmän ärsyttävien aineiden määrittämisessä (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Vaikka tilastollisesti merkittävää paksuuden kasvua voi esiintyä silloinkin, kun korvan paksuus on alle 25 prosenttia, sen ei katsota liittyvän erityisesti erittäin voimakkaaseen ärsytykseen (30) (32) (33) (34).

24. Seuraavat kliiniset havainnot voivat yhdennetyn arvioinnin osana olla osoituksena koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta (35) (36) ja voivat näin ollen olla osoituksena suurimmasta annostasosta, jota varsinaisessa LLNA-menetelmässä voidaan käyttää: muutokset hermoston toiminnassa (esimerkiksi karvojen jäykistyminen, ataksia, vapina ja kouristukset); muutokset käyttäytymisessä (esimerkiksi aggressiivisuus, muutokset turkin hoidossa, aktiivisuustason huomattava muuttuminen); muutokset hengityksessä (hengityksen säännöllisyyden ja syvyyden muutokset, kuten hengenahdistus, hengen haukkominen ja rahina) sekä muutokset ravinnon ja veden kulutuksessa. Arvioinnissa on huomioitava myös letargian ja/tai passiivisuuden merkit, vähäistä tai hetkittäistä kipua suuremman kivun ja kärsimyksen mahdolliset kliiniset merkit tai eläimen painon yli viiden prosentin laskeminen päivästä 1 päivään 6 sekä kuolleisuus. Kuolevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti (37).

▼M3

Varsinaisen tutkimuksen aikataulu

25. Määrityksen aikataulu on seuraava:

— *Päivä 1:* Määritetään ja kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään ja kirjataan mahdolliset kliiniset havainnot. Kunkin korvan takaosaan applikoidaan 25 µl testiaineen, kantaja-aineen tai positiivisen kontrollikemikaalin (jota käytetään aina tai jota on käytetty hiljattain, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat) sopivaa laimennosta.

— *Päivät 2 ja 3:* Toistetaan päivänä 1 toteutettu applikointimenettely.

— *Päivät 4 ja 5:* Ei käsittelyä.

— *Päivä 6:* Kirjataan kunkin eläimen paino. Ruiskutetaan 250 µl steriiliä fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS), joka sisältää 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) tritiumilla merkittyä (^{3}H)-metyylitymidiiniä, kaikkiin testi- ja kontrolliryhmän hiiriin häntävaltimon kautta. Vaihtoehtoisesti ruiskutetaan 250 µl steriiliä PBS:ää, joka sisältää 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jodideoksiuridiinia ja 10^{-5}-molaarista fluorideoksiuridiinia, kaikkiin hiiriin häntävaltimon kautta. Viiden tunnin (5 h) kuluttua eläimet lopetetaan humaanisti. Kummastakin korvasta leikataan irti dreneeraavat korvalehden imusolmukkeet, ja kunkin eläimen imusolmukkeet upotetaan PBS:ään (vain yhden yksilön näytteet); vaihtoehtoisesti kummankin korvan imusolmukkeet voidaan leikata ja koko koeryhmän imusolmukkeet voidaan upottaa PBS:ään (käsittelyryhmän näytteet yhdistetään). Imusolmukkeiden tunnistukseen ja leikkaamiseen liittyvät yksityiskohdat ja kaaviot esitetään lähteessä (12). Paikallista ihovastetta voidaan seurata varsinaisessa tutkimuksessa tarkemmin niin, että tutkimussuunnitelmaan sisällytetään täydentäviä parametreja, kuten korvan eryteeman pisteytys tai korvan paksuutta koskevat mittaustulokset (saadaan joko paksuusmittarilla tai ruumiinavauksen yhteydessä tehtävillä korvan lävistämiseen tarvittavan massan mittauksilla).

Solususpensioiden valmistus

26. Yksittäisten eläinten imusolmukeparien soluista tai testiryhmien yhdistetyistä imusolmukesoluista valmistetaan suspensio, jossa kaikki solut ovat irrallaan muista (yksisolususpensio), mekaanisesti hajottamalla solukertymät painamalla ne varovaisesti ruostumattoman terässeulan läpi (silmäkoko 200 µm) tai käyttämällä muuta yksisolususpension valmistamiseksi hyväksyttyä tekniikkaa. Imusolmukesolut pestään kahdesti runsaalla PBS:llä, ja DNA saostetaan 5-prosenttisessa trikloorietikkahapossa 4 °C:n lämpötilassa 18 tunnin ajan (3). Pelletit voidaan joko suspendoida uudelleen 1 ml:aan trikloorietikkahappoa ja siirtää tuikeputkiin, joissa on 10 ml tuikenestettä ^{3}H-laskentaa varten, tai siirtää suoraan gammalaskentaputkiin ^{125}I-laskentaa varten.

Solujen proliferaation (inkorporoituneen radioaktiivisuuden) määritys

27. ^{3}H-metyylitymidiinin inkorporoituminen mitataan β-tuikelaskennalla hajoamisina minuutissa (DPM). ^{125}I-jodideoksiuridiinin inkorporoituminen mitataan ^{125}I-laskennalla ja ilmoitetaan niin ikään DPM-arvona. Inkorporoituminen ilmoitetaan DPM:nä joko eläintä kohti tai testiryhmää kohti.

Vähemmän koe-eläimiä käyttävä LLNA-menetelmä

28. Vaihtoehtoista, vähemmän koe-eläimiä käyttävää rLLNA-menetelmää (16) (17) (18) voidaan soveltaa tietyissä tapauksissa, joissa ihoherkistyspotentiaalin negatiivinen oletus on sääntelysyistä vahvistettava, edellyttäen että kaikkia muita tässä testimenetelmässä kuvattuja LLNA-menettelyn vaatimuksia noudatetaan. rLLNA-menettelyn käyttö on perusteltava selvästi ja tieteellisesti ennen menetelmän käyttöä. Jos tulos on positiivinen tai epäselvä, löydöksen tulkitsemiseksi tai selventämiseksi voidaan tarvita täydentäviä testejä.

▼M3

29. LLNA- ja rLLNA-testimenetelmien ainoana erona on erilainen annosryhmien määrä, minkä vuoksi rLLNA-menetelmä ei anna tietoja annosvasteesta. Näin ollen rLLNA-menettelyä ei pidä käyttää, jos annosvastetta koskevia tietoja tarvitaan. Kuten useisiin annoksiin perustuvassa LLNA-menettelyssä, myös rLLNA-menettelyssä arvioitavan testiaineen konsentraationa on käytettävä suurinta konsentraatiota, joka ei vielä aiheuta hiiressä koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta ihoärsytystä (katso 18 kohta).

HAVAINNOT

Kliiniset havainnot

30. Kustakin hiirestä on päivittäin havainnoitava huolellisesti mahdolliset kliiniset merkit joko annostelualueen paikallisesta ärsytyksestä tai koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti erikseen kustakin hiirestä. Seurantasuunnitelmissa on esitettävä myös perusteet, joiden avulla voidaan nopeasti tunnistaa hiiret, joissa havaitaan merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta, erittäin voimakkaasta paikallisesta ihoärsytyksestä tai ihosyövyttävyydestä, jotta ne voitaisiin lopettaa (37).

Ruumiinpainot

31. Kuten 25 kohdassa todetaan, kukin eläin on punnittava erikseen testin alussa ja aikataulun mukaisesti humaanin lopettamisen yhteydessä.

TULOSTEN LASKEMINEN

32. Kunkin käsittelyryhmän tulokset ilmoitetaan stimulaatioindeksinä (SI). Yksilönäytteistä SI-arvo saadaan jakamalla kunkin testiaineryhmän ja positiivisen kontrolliryhmän hiirikohtaisista DPM-arvoista laskettu keskiarvo liuotin/kantaja-aineryhmän vastaavalla tuloksella. Kantaja-aineella käsiteltyjen kontrolliryhmien SI:n keskiarvo on 1. Ryhmänäytteistä SI-arvo saadaan jakamalla kunkin testiryhmän yhdistetty radioaktiivinen inkorporoituminen kantaja-aineryhmän yhdistetyllä inkorporoitumisella, jolloin saadaan SI:n keskiarvo.

33. Tulos katsotaan positiiviseksi, kun SI $\geq$ 3. Päätettäessä, katsotaanko rajatulos positiiviseksi, voidaan myös käyttää annosvasteen voimakkuutta, tilastollista merkitsevyyttä sekä liuottimen/kantaja-aineen ja positiivisen kontrollikemikaalin vasteiden yhdenmukaisuutta (4) (5) (6).

34. Jos saatuja tuloksia pitää selventää, huomioon on otettava testiaineen erilaiset ominaisuudet, mukaan luettuina mahdolliset rakenteelliset yhtäläisyydet tunnettuihin ihoherkistystä aiheuttaviin aineisiin, sen hiirelle mahdollisesti aiheuttama erittäin voimakas paikallinen ihoärsytys ja havaitun annosvasteen luonne. Näitä ja muita huomionarvoisia seikkoja käsitellään yksityiskohtaisesti lähteessä (7).

35. Kun radioaktiivisuuden mittaustuloksia kerätään erikseen kustakin hiirestä, voidaan niiden perusteella analysoida tilastollisesti mahdollista annosvastetta ja sen tasoa. Tilastollisessa arvioinnissa voidaan myös arvioida annosvasteen voimakkuutta ja tehdä asianmukaisesti mukautettuja vertailuja testiryhmillä (esimerkiksi pareittain annoksen saaneen ryhmän vertailu kantaja-ainekontrolliryhmään, kun kontrolli on tehnyt samanaikaisesti). Tilastoanalyyseissä voidaan käyttää esimerkiksi lineaarista regressiota tai Williamin testiä, joilla arvioidaan annos-vastesuuntauksia, sekä Dunnettin testiä, jolla vertaillaan pareja. Tutkijan on otettava asianmukaisen tilastollisen analyysimenetelmän valinnassa huomioon varianssien mahdolliset erot ja muut vastaavat ongelmat, jotka saattavat edellyttää määritystulosten muuntamista tai non-parametrista tilastollista analyysia. Joka tapauksessa tutkija voi joutua tekemään SI-laskelmia ja tilastoanalyyseja siten, että mukana on tai ei ole tiettyjä määrityskohtia koskevia tietoja (ns. käyrän ulkopuolella olevat tulokset).

▼M3

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Mittaustulokset

36. Mittaustulokset on esitettävä taulukkona. Yksilönäytteiden osalta esitetään eläinkohtaiset DPM-arvot, ryhmän eläinkohtaisen DPM-arvon keskiarvo, siihen liittyvä virhe (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe) sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen SI vastaavaan kantaja-ainekontrolliryhmään verrattuna. Ryhmänäytteiden osalta esitetään keskimääräinen DPM / DPM:n mediaani sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen SI samanaikaisesti käsiteltyyn kantaja-ainekontrolliryhmään verrattuna.

Testiraportti

37. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrolliaineet

— tunnistetiedot (esimerkiksi CAS- ja EC-numerot, jos tiedossa; alkuperä, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, eränumero),

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet (esimerkiksi haihtuvuus, stabiilisuus, liukoisuus),

— jos kyseessä on seos, sen koostumus ja ainesosien suhteelliset osuudet.

Liuotin/kantaja-aine

— tunnistetiedot (puhtaus, tarvittaessa konsentraatio, käytetty tilavuus),

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläimet

— CBA-hiirten alkuperä,

— eläinten mikrobiologinen tila, jos se on tiedossa,

— eläinten määrä ja ikä,

— eläinten alkuperä, koe-eläintilat, ruokavalio ja niin edelleen.

Testiolosuhteet

— tiedot testiaineen valmistelusta ja annostelusta,

— perustelut annostasojen valinnalle (mukaan luettuina kartoitustestin tulokset, jos sellainen on tehty),

— käytetyt kantaja- ja testiaineiden konsentraatiot ja annostellun testiaineen kokonaismäärä,

— tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan luettuina ruokavalion tyyppi/alkuperä, veden alkuperä),

— tiedot käsittely- ja näytteenottoaikatauluista,

— toksisuuden mittausmenetelmät,

— tutkimusten positiivisuuden tai negatiivisuuden arviointiperusteet,

— tiedot menettelystä poikkeamisesta ja selvitys siitä, miten poikkeaminen vaikuttaa tutkimussuunnitelmaan ja tuloksiin.

Luotettavuuden tarkistus

— yhteenveto viimeisimmän luotettavuustarkistuksen tuloksista, mukaan luettuina tiedot käytetystä testiaineesta, konsentraatiosta ja kantaja-aineesta,

— testauslaboratorion samanaikaisesti tehtyjen ja/tai aiemmin tehtyjen positiivisten ja samanaikaisesti tehtyjen negatiivisten kontrollien tulokset,

▼M3

— jos määrityksessä ei ollut samanaikaisesti tehtyä positiivista kontrollia, on annettava viimeisimmän positiivisen kontrollin päivämäärä ja laboratorioraportti sekä yksityiskohtainen selvitys laboratorion aiemmista positiivisista kontrollitiedoista, joiden perusteella positiivista kontrollia ei tehty.

Tulokset

— kunkin hiiren paino annostelun alussa ja aikataulun mukaisen lopettamisen yhteydessä sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen virhetermi ja siihen liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe),

— toksisuuden ilmeneminen ajan funktiona ja toksisuuden merkit, mukaan luettuna annostelualueen ihoärsytys, jos sellaista esiintyy, erikseen kullekin eläinyksilölle,

— taulukko kunkin hiiren (yksilönäytteet) tai kunkin käsittelyryhmän (ryhmänäytteet) keskimääräisistä DPM- ja SI-arvoista / DPM:n ja SI:n mediaaneista,

— kunkin käsittelyryhmän hiirikohtaisen DPM-arvon keskimääräinen virhetermi ja siihen liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta ja keskiarvon keskivirhe) sekä käyrän ulkopuolella olevien vasteiden analyysin tulokset kullekin käsittelyryhmälle käytettäessä yksittäisiä eläimiä,

— testiaineella ja kontrolliaineella käsitellyille ryhmille yksilönäytteiden yhteydessä laskettu SI ja asianmukaisesti määritetty vaihteluväli, jossa otetaan huomioon eläinten välinen vaihtelu,

— annos-vastesuhde,

— tarvittaessa tilastolliset analyysit.

Tulosten pohdinta

— tulosten lyhyt kommentointi, annos-vasteanalyysi ja tarvittaessa tilastollinen analyysi sekä johtopäätös siitä, onko testiainetta pidettävä ihoherkistystä aiheuttavana.

LÄHDELUETTELO

(1) OECD (2002). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429. Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) Kimber, I. ja Basketter, D. A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food Chem. Toxicol*. 30, s. 165–169.

(3) Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes, E. W. ja Basketter, D. A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*. 93, s. 13–31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladies, G. S., Loveless, S. E. ja Hastings, K. L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health* 53, s. 563–79.

(5) Chamberlain, M. ja Basketter, D. A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol*. 34, s. 999–1002.

(6) Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. ja Loveless, S. E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol*. 34, s. 985–997.

(7) Basketter, D. A., Gerberick, G. F. ja Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol*. 36, s. 327–33.

▼M3

(8) Van Och, F. M. M., Slob, W., De Jong, W. H., Vandebriel, R. J. ja Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*. 146, s. 49–59.

(9) Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34, s. 258–273.

(10) Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34, s. 274–286.

(11) Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34, s. 249–257.

(12) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH-julkaisunumero 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf

(13) OECD (1992). *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(14) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(15) Dearman, R. J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D. A. ja Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *J. Appl. Toxicol*. 18, s. 281–284.

(16) Kimber, I., Dearman, R. J., Betts, C. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Patlewicz, G. Y. ja Basketter, D. A. (2006). The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis* 54, s. 181–185.

(17) ESAC (2007). Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA). Euroopan komission pääosasto – yhteinen tutkimuskeskus, kuluttajien terveyden ja kuluttajansuojan laitos, Euroopan vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskus, huhtikuu 2007. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf

(18) ICCVAM (2009). The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products. NIH-julkaisunumero 09-6439. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/

(19) ICCVAM (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH-julkaisunumero 99-4494. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llna-rep.pdf

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. ja Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.* 46, s. 1896–1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. ja Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 55, s. 90–96.

(22) ICCVAM (2009). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions. NIH-julkaisunumero 10-7512. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/

(23) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7. painos. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H. F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.* 238, s. 71–89.

(25) OECD (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404. Pariisi, Ranska. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

(26) Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L. ja DeGeorge, G. L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist* 96, s. 235.

(27) ICCVAM (2009). Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf

(28) Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. ja Meade, B. J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug. Chem. *Toxicol.* 21, s. 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. ja Vohr, V. W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 153, s. 83–94.

(30) Woolhiser, M. R., Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.* 8, s. 245–256.

(31) Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol*. 22, s. 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A. O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. ja Vohr, H. W. (2005). A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*. 212, s. 60–68.

(33) Vohr, H. W. ja Ahr, H. J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.* 79, s. 721–728.

(34) Patterson, R. M., Noga, E. ja Germolec, D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*. 115, s. 1023–1028.

(35) OECD (1987). *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402. Pariisi, Ranska. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm

(37) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼M3

Lisäys 1

Suoritusvaatimukset ehdotettujen samanlaisten tai mukautettujen ihoherkistyksen LLNA-testimenetelmien arviointia varten

JOHDANTO

1. Suoritusvaatimusten tarkoituksena on antaa arviointiperusteet, joiden avulla voidaan määrittää, ovatko uudet testimenetelmät – niin yksinoikeudelliset (eli tekijänoikeudelliset, tavaramerkityt tai rekisteröidyt) kuin muut kuin yksinoikeudelliset – riittävän tarkkoja ja luotettavia tiettyjä testaustarkoituksia varten. Näitä validoituihin ja hyväksyttyihin testimenetelmiin perustuvia suoritusvaatimuksia voidaan käyttää muiden samanlaisten menetelmien (niin sanottujen me-too-testien) luotettavuuden ja täsmällisyyden arviointiin, kun kyseiset menetelmät perustuvat samanlaisiin tieteellisiin periaatteisiin ja niillä mitataan tai ennakoidaan samaa biologista tai toksista vaikutusta (14).

2. Ennen menetelmien muuttamisen (eli hyväksytyn testimenetelmän ehdotetun mahdollisen parantamisen) hyväksymistä on arvioitava ehdotettujen muutosten vaikutus testin suorituskykyyn ja se, missä määrin kyseiset muutokset vaikuttavat validointimenettelyn muita osia varten saatavilla oleviin tietoihin. Ehdotettujen muutosten määrästä ja luonteesta, saaduista mittaustuloksista ja kyseisiä muutoksia tukevasta asiakirja-aineistosta riippuen menetelmän muutoksille on tehtävä uudelle testille kuvatun kaltainen validointimenettely tai tarvittaessa luotettavuuden ja merkityksellisyyden rajattu arviointi käyttämällä vakiintuneita suoritusvaatimuksia (14).

3. Tähän testaustarkoitukseen käytettäväksi ehdotettujen samanlaisten tai mukautettujen menetelmien luotettavuus ja tarkkuus olisi määritettävä käyttämällä kemikaaleja, jotka edustavat kattavasti kaikkia LLNA:n pisteytysarvoja. Eläinten tarpeettoman käytön välttämiseksi suositellaan painokkaasti, että mallien kehittäjät kuulevat asiasta vastaavia viranomaisia ennen validointitutkimusten käynnistämistä suoritusvaatimusten ja tässä testimenetelmässä esitettyjen ohjeiden mukaisesti.

4. Nämä suoritusvaatimukset perustuvat Yhdysvaltain US-ICCVAM:in, EU:n EC-ECVAM:in ja Japanin JaCVAM:in yhdenmukaistettuihin suoritusvaatimuksiin (12), joilla arvioidaan LLNA:n samanlaisten tai mukautettujen versioiden pätevyyttä. Suoritusvaatimukset koskevat testimenetelmän olennaisia osia, suositeltuja vertailukemikaaleja ja tarkkuus- ja luotettavuusvaatimuksia, jotka ehdotetun menetelmän olisi saavutettava tai ylitettävä.

I. **Olennaiset testimenetelmän osat**

5. Jotta samanlainen tai mukautettu LLNA-menetelmä vastaisi toiminnallisesti ja mekaanisesti LLNA:ta jotta varmistettaisiin, että sillä mitataan samaa biologista vaikutusta, testausprotokollassa on oltava seuraavat osat:

— Testiainetta on applikoitava paikallisesti hiiren molempiin korviin.

— Lymfosyyttien proliferaatio on mitattava niissä imusolmukkeissa, jotka dreneeraavat alueelta, johon testiaine on annosteltu.

— Lymfosyyttien proliferaatio on mitattava ihoherkistyksen induktiovaiheessa.

▼M3

— Testiaineiden suurimpana valittuna annoksena on käytettävä suurinta konsentraatiota, joka ei vielä aiheuta hiiressä koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä. Positiivisten vertailukemikaalien suurimpana annoksena on käytettävä annosta, joka vastaa vähintään vastaavien vertailukemikaalien LLNA EC3 -arvoja (katso taulukko 1) ilman, että se aiheuttaa hiiressä koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä.

— Jokaiseen tutkimukseen on sisällytettävä samaan aikaan määritetty kantaja-ainekontrolliryhmä ja tarvittaessa myös samaan aikaan määritetty positiivinen kontrollikemikaali.

— Kussakin annosryhmässä on oltava vähintään neljä eläintä.

— Tietoja voidaan kerätä joko eläinkohtaisesti tai ryhmäkohtaisesti.

Jos kaikkia vaatimuksia ei täytetä, suoritusvaatimuksilla ei voida validoida samanlaista tai mukautettua menetelmää.

II. **Vertailukemikaalien vähimmäisluettelo**

6. Yhdysvaltain US-ICCVAM:in, EU:n EC-ECVAM:in ja Japanin JaCVAM:in yhdenmukaistetuissa suoritusvaatimuksissa (12) on määritetty 18 pakollista vähimmäisvertailukemikaalia ja neljä valinnaista vertailukemikaalia (aineita, joilla saadaan LLNA-menetelmässä aikaan vääriä positiivisia tai vääriä negatiivisia tuloksia ihmis- ja marsutestien tuloksiin verrattuna (B.6 tai OECD:n testiohje 406) (13) ja joiden avulla voidaan näin ollen osoittaa LLNA-menetelmää vastaava tai parempi suorituskyky), jotka on sisällytetty LLNA-menetelmän suoritusvaatimuksiin. Näiden kemikaalien valinnassa on sovellettu seuraavia perusteita:

— Vertailukemikaalien luettelo edustaa niitä ainetyyppejä, joiden ihoärsytyspotentiaalia yleensä testataan, ja kaikkia niitä vasteita, joita LLNA-menetelmällä voidaan mitata tai ennustaa.

— Aineiden kemiallinen rakenne on määritetty täsmällisesti.

— LLNA-menetelmän tiedot marsutesteistä (B.6; OECD:n testiohje 406) (13) ja mahdolliset tiedot ihmiskokeista ovat saatavilla kunkin aineen osalta.

— Aineet ovat helposti saatavilla kaupallisista lähteistä.

Suositellut vertailukemikaalit luetellaan taulukossa 1. Ehdotetuilla vertailukemikaaleilla tehtävät tutkimukset on arvioitava siinä kantaja-aineessa, joiden kanssa ne luetellaan taulukossa 1. Jos luettelossa mainittua ainetta ei ole saatavilla, muita edellä mainitut valintaperusteet täyttäviä aineita voidaan käyttää asianmukaisin perusteluin.

▼M3

Taulukko 1

Suositellut vertailukemikaalit LLNA-menetelmän suoritusvaatimuksia varten

Numero	Kemikaalit ([1])	CAS-nro	Olomuoto	K-aine ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Todellinen EC3-vaihteluväli	LLNA vs. M	LLNA vs. ihminen
1	5-Kloori-2-metyyli-4-isotiatsolin-3-oni (CMI) / 2-metyyli-4-isotiatsolin-3-oni (MI) ([5])	26172-55-4/ 2682-20-4	Nest.	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	EL	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Kiint.	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,09-4	+/+	+/+
3	4-Fenyleenidiamiini	106-50-3	Kiint.	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	Kobolttikloridi	7646-79-9	Kiint.	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenoli	97-54-1	Nest.	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-Merkaptobentsotiatsoli	149-30-4	Kiint.	DMF	1,7	1	0,85–3,4	EL	+/+	+/+
7	Sitraali	5392-40-5	Nest.	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Nest.	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	Eugenoli	97-53-0	Nest.	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	Fenyylibentsoaatti	93-99-2	Kiint.	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	Kanelialkoholi	104-54-1	Kiint.	AOO	21	1	10,5–42	EL	+/+	+/+
12	Imidatsolidinyyliurea	39236-46-9	Kiint.	DMF	24	1	12–48	EL	+/+	+/+
13	Metyylimetakrylaatti	80-62-6	Nest.	AOO	90	1	45–100	–	+/+	+/+
14	Klooribentseeni	108-90-7	Nest.	AOO	25	1	ES	ES	–/–	–/ (*)
15	Isopropanoli	67-63-0	Nest.	AOO	50	1	ES	ES	–/–	–/+

▼M3

Numero	Kemikaalit ([1])	CAS-nro	Olomuoto	K-aine ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Todellinen EC3-vaihte-luväli	LLNA vs. M	LLNA vs. ihminen
16	Maitohappo	50-21-5	Nest.	DMSO	25	1	ES	ES	–/–	–/ (*)
17	Metyylisalisylaatti	119-36-8	Nest.	AOO	20	9	ES	ES	–/–	–/–
18	Salisyylihappo	69-72-7	Kiint.	AOO	25	1	ES	ES	–/–	–/–
Valinnaiset aineet, joilla osoitetaan suorituskyvyn paraneminen LLNA-menetelmään verrattuna										
19	Natriumlauryylisulfaatti	151-21-3	Kiint.	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/–	+/–
20	Etyleeniglykolidimetakrylaatti	97-90-5	Nest.	MEK	28	1	14–56	EL	+/–	+/+
21	Ksyleeni	1330-20-7	Nest.	AOO	95,8	1	47,9–100	EL	+/ (**)	+/–
22	Nikkelikloridi	7718-54-9	Kiint.	DMSO	5	2	ES	ES	–/+	–/+

Lyhenteet: AOO = asetoni:oliiviöljy (4:1 v/v); CAS-nro = Chemical Abstracts Service Number; DMF = *N,N*-dimetyyliformamidi; DMSO = dimetyylisulfoksidi; DNCB = 2,4-dinitroklooribentseeni; EC3 = arvioitu konsentraatio, jolla saadaan aikaan stimulaatioindeksi 3; M = marsutestin tulos (B.6 tai OECD:n testiohje 406) (12); HCA = heksyylikanelialdehydi; Nest. = neste; LLNA = hiirelle tehtävän paikallisen imusolmukemääritysmenetelmän tulos (B.42 tai OECD:n testiohje 429) (1); MEK = metyylietyyliketoni; ES = ei sovelleta, koska stimulaatioindeksi < 3; EL = ei laskettu, koska tiedot on saatu yhdestä tutkimuksesta; Kiint. = kiinteä; K-aine = testissä käytettävä kantaja-aine.

(*) Oletetaan, että ei aiheuta ihoherkistystä ihmisillä, koska kliinisten lapputestien tuloksia ei ole saatavilla, sitä ei ole sisällytetty lapputestipaketin allergeeniksi eikä ihmisten herkistymisestä ole saatavilla tapausselvityksiä.

(**) Marsutestien tietoja ei ole saatavilla.

([1]) Kemikaalit on valmistettava päivittäin, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

([2]) Koska erilaiset kantaja-aineet voivat vaikuttaa LLNA-menetelmän suorituskykyyn, kullekin vertailukemikaalille suositeltua kantaja-ainetta on käytettävä (24) (32).

([3]) Keskiarvo, jos saatavilla on useampi kuin yksi EC3-arvo. Negatiivisten aineiden (stimulaatioindeksi < 3) osalta esitetään suurin testattu konsentraatio.

([4]) Niiden LLNA-tutkimusten määrä, joista tiedot on saatu.

([5]) Kaupallisesti saatavilla Kathon CG:nä (CAS-nro 55965-84-9), joka on CMI:n ja MI:n seos (3:1). Kunkin osan suhteelliset konsentraatiot vaihtelevat välillä 1,1–1,25 % (CMI) ja 0,3–0,45 % (MI). Inaktiivisina osina ovat magnesiumsuolat (21,5–24 %) ja kuparinitraatti (0,15–0,17 %), ja muu osa valmisteesta (74–77 %) on vettä. Kathon CG on helposti saatavilla Sigma-Aldrich-yrityksen ja Rohm and Haas -yrityksen (nykyisin Dow Chemical Corporation) välityksellä.

▼M3

III. **Määritellyt luotettavuus- ja tarkkuusvaatimukset**

7. Samanlaisen tai mukautetun LLNA-menetelmän tarkkuuden on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin LLNA-suoritusvaatimuksissa määritelty tarkkuus, kun sitä arvioidaan käyttämällä 18:aa säädettyä vähimmäisvertailukemikaalia. Uudella tai mukautetulla menetelmällä on voitava suorittaa oikea luokittelu, joka perustuu kyllä/ei-päätökseen. Uudella tai mukautetulla menetelmällä ei kuitenkaan välttämättä voida luokitella asianmukaisesti kaikkia säädettyjä vähimmäisvertailukemikaaleja. Jos esimerkiksi yksi heikkoa herkistystä aiheuttavista aiheista luokitellaan väärin, vastaava suorituskyky voidaan osoittaa esittämällä virheellisen luokittelun perustelut ja muut tarvittavat tiedot (esimerkiksi testitulokset, joilla saadaan oikea sellaisten muiden aineiden luokittelu, joiden fyysiset, kemialliset ja herkistävät ominaisuudet vastaavat väärin luokitellun vertailukemikaalin ominaisuuksia). Tällaisessa tilanteessa uuden tai mukautetun LLNA-testimenetelmän validoinnin tila arvioidaan tapauskohtaisesti.

Laboratorionsisäinen uusittavuus

8. Laboratorionsisäisen uusittavuuden määrittämiseksi uutta tai mukautettua LLNA-menetelmää on arvioitava käyttämällä herkistävää ainetta, jonka ominaisuudet on LLNA-menetelmässä määritetty hyvin. Sen vuoksi LLNA-menetelmän suoritusvaatimukset perustuvat heksyylikanelialdehydillä (HCA) toistuvasti tehtyjen testien tulosten vaihteluun. Laboratorionsisäisen luotettavuuden arvioimiseksi HCA:n kynnyskonsentraatioarviot (ECt) on määritettävä neljässä eri testissä niin, että testit tehdään vähintään viikon välein. Laboratorionsisäinen uusittavuus hyväksytään, jos laboratorion kussakin HCA-testissä ECt:ksi saadaan 5–20 %, mikä vastaa LLNA-menetelmässä 0,5–2,0 kertaa HCA:lle määritettyä keskimääräistä EC3:a (10 %) (katso taulukko 1).

Laboratorioidenvälinen uusittavuus

9. Uuden tai mukautetun LLNA-menetelmän laboratorioidenvälistä uusittavuutta on arvioitava käyttämällä kahta herkistävää ainetta, joiden ominaisuudet on LLNA-menetelmässä määritetty hyvin. LLNA-menetelmän suoritusvaatimukset perustuvat HCA:lla ja 2,4-dinitroklooribentseenillä (DNCB) eri laboratorioissa tehtyjen testien tulosten vaihteluun. ECt on määritettävä riippumattomasti yhden sellaisen tutkimuksen perusteella, joka tehdään vähintään kolmessa eri laboratoriossa. Laboratorioidenvälinen uusittavuus hyväksytään, jos kussakin laboratoriossa ECt:ksi saadaan HCA-testissä 5–20 % ja DNCB-testissä 0,025–0,1 %, mikä vastaa LLNA-menetelmässä 0,5–2,0 kertaa HCA:lle määritettyä keskimääräistä EC3:a (10 %) ja DNCB:lle määritettyä EC3:a (0,05 %) (katso taulukko 1).

▼**M3**

Lisäys 2

Määritelmät

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus mittaa testimenetelmän suorituskykyä, ja se on yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (14).

Vertailuaine: Herkistävä tai muu kuin herkistävä aine, jota käytetään testiaineen vertailustandardina. Vertailuaineella olisi oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana; ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testattavana olevalla ainetyypillä; iii) tunnetut fysikaaliskemialliset ominaisuudet, iv) sopivuutta tukevia tietoja tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellun vasteen vaihteluvälillä.

Kynnyskonsentraatioarvio (ECt): Testiaineen arvioitu konsentraatio, jolla saadaan aikaan stimulaatioindeksi, joka osoittaa positiivisen vasteen.

Kynnyskonsentraatio-3 (EC3): Testiaineen arvioitu konsentraatio, jolla saadaan aikaan stimulaatioindeksi 3.

Väärä negatiivinen: Testiaine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein negatiiviseksi tai inaktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on positiivinen tai aktiivinen.

Väärä positiivinen: Testiaine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein positiiviseksi tai aktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on negatiivinen tai inaktiivinen.

Vaarallisuus: Mahdollisuus kielteiseen terveys- tai ympäristövaikutukseen. Kielteinen vaikutus edellyttää altistumista vähintään tietyllä tasolla.

Laboratorioidenvälinen uusittavuus: Se, missä määrin erilaiset valtuutetut laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samoja tutkimussuunnitelmia ja testaamalla samoja testiaineita. Laboratorioidenvälinen uusittavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyssä, ja sillä osoitetaan, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (14).

Laboratorionsisäinen uusittavuus: Se, missä määrin tietyn laboratorion pätevä henkilöstö voi saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimussuunnitelmaa eri ajankohtina (14).

Me-too-testi: Puhekielinen nimitys testimenetelmälle, joka on rakenteellisesti ja funktionaalisesti samanlainen kuin validoitu ja hyväksytty vertailutestimenetelmää. Tällainen menetelmä voitaisiin myös validoida. Tarkoittaa samaa kuin ’samanlainen” testimenetelmä (14).

Käyrän ulkopuolella oleva vaste: Käyrän ulkopuolella olevalla vasteella tarkoitetaan havaintoa, joka poikkeaa merkittävästi muista populaation satunnaistetuista arvoista.

Suoritusvaatimukset: Validoituun testimenetelmään perustuvat vaatimukset, joiden avulla arvioidaan ehdotetun toiminnallisesti ja mekanistisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Suoritusvaatimuksiin sisältyvät i) testimenetelmän oleelliset osat; ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) samanlaiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailuaineiden vähimmäisluettelon avulla (14).

Yksinoikeudellinen testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka valmistamista ja jakelua rajoitetaan patenteilla, tekijänoikeuksilla, tavaramerkeillä ynnä muilla.

▼**M3**

Laadunvarmistus: Hallintomenettely, jossa testausta suorittavista henkilöistä riippumattomat henkilöt arvioivat laboratorion testausstandardien, vaatimusten ja kirjanpitomenettelyjen noudattamista ja tiedonsiirron tarkkuutta.

Vertailukemikaalit: Validointimenettelyyn valitut kemikaalit, joiden vasteet *in vitro* -vertailutestijärjestelmässä tai *in vivo* kyseisessä lajissa ovat tiedossa. Näiden kemikaalien on vastattava niitä kemikaaliluokkia, joiden yhteydessä kyseistä testimenetelmää todennäköisesti käytetään, ja niiden on edustettava kaikkia niitä vasteita, joita testimenetelmän kohteena olevilta kemikaaleilta voidaan odottaa (voimakkaista lieviin ja negatiivisiin). Validointimenettelyn eri vaiheita sekä eri testimenetelmiä ja testitarkoituksia varten voidaan vaatia erilaisia vertailukemikaaleja (14).

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja aineen vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa kyseisen aineen biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (konkordanssi) (14).

Luotettavuus: Testimenetelmän uusittavuus samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pitkällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Se arvioidaan laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus (14).

Ihoherkistys: Immunologinen prosessi, joka aiheutuu herkän yksilön paikallisesta altistamisesta kemialliselle allergeenille, joka aiheuttaa iholla immuunivasteen, joka voi johtaa kosketusherkistykseen.

Stimulaatioindeksi (SI): Testiaineen ihoärsytyspotentiaalin arvioimiseksi laskettu arvo, jolla esitetään käsiteltyjen ryhmien soluproliferaation ja samaan aikaan kantaja-aineella käsitellyn kontrolliryhmän soluproliferaation välinen suhde.

Testiaine (testikemikaali): Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jolle on tehty validointitutkimukset sen merkityksellisyyden (myös tarkkuuden) ja luotettavuuden määrittämiseksi tiettyä tarkoitusta varten. On syytä pitää mielessä, että validoidun testimenetelmän suorituskyky tarkkuuden ja luotettavuuden osalta ei välttämättä ole riittävä, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen (14).

▼B

B.43. **NEUROTOKSISUUSTUTKIMUS JYRSIJÖILLÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 424 (1997).

Tämän testimenetelmän tarkoituksena on tuottaa tiedot, joilla voidaan varmistaa kemikaalien mahdollinen neurotoksisuus täysikasvuisilla eläimillä tai kuvata se tarkemmin. Testi voidaan joko yhdistää toistuvan annostelun toksisuustutkimusten nykyisiin testimenetelmiin tai suorittaa erillisenä tutkimuksena. Tällä testimenetelmällä tehtävien tutkimusten suunnittelussa on suositeltavaa käyttää apuna OECD:n ohjeasiakirjaa neurotoksisuuden testistrategioista ja -menetelmistä (Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1)). Tämä on erityisen tärkeää suunniteltaessa muutoksia menetelmän rutiinikäyttöön suositeltuihin havaintoihin ja testin suoritukseen. Ohjeasiakirjan tarkoituksena on helpottaa muiden testien valintaa tiettyissä oloissa.

Tällä menetelmällä ei arvioida sikiönkehitykseen liittyvää neurotoksisuutta.

1.1 JOHDANTO

Arvioitaessa kemikaalien toksisia ominaisuuksia on tärkeää ottaa huomioon mahdolliset neurotoksiset vaikutukset. Toistuvan annostelun systeemisen toksisuuden testimenetelmään sisältyy jo havaintojen tekoa mahdollisen neurotoksisuuden seulomiseksi. Tämän testimenetelmän avulla voidaan suunnitella tutkimus, jolla saadaan lisätietoja toistuvan annostelun systeemisen toksisuuden tutkimuksissa havaituista neurotoksisista vaikutuksista tai varmistetaan nämä vaikutukset. Tiettyjen kemikaaliluokkien mahdollinen neurotoksisuus voi kuitenkin antaa viitteitä siitä, että niiden arviointi on tarkoituksenmukaisempaa tällä menetelmällä, kun mahdollista neurotoksisuutta ei ole aiemmin osoitettu toistuvan annostelun systeemisen toksisuuden tutkimuksissa. Huomioon otettavia seikkoja ovat esimerkiksi

— havainnot hermostollisista oireista tai neuropatologisista vaurioista muissa toksisuustutkimuksissa kuin toistuvan annostelun systeemisen toksisuuden tutkimuksissa tai

— rakenteellinen sukulaisuus tai muut tiedot, jotka yhdistävät kyseiset kemikaalit tunnettuihin neurotoksisiin aineisiin.

Tämän testimenetelmän käyttäminen voi olla tarkoituksenmukaista muissakin tapauksissa. Yksityiskohtaisempia tietoja viitteessä (1).

Menetelmä on kehitetty sellaiseksi, että se voidaan räätälöidä erityistarpeisiin, jotta voidaan varmistaa kemikaalin spesifinen histopatologinen ja käyttäytymiseen vaikuttava neurotoksisuus sekä kuvata neurotoksiset vasteet ja kvantifioida ne.

▼B

Aiemmin neurotoksisuus rinnastettiin neuropatiaan, johon liittyi neuropatologisia vaurioita tai hermoston toimintahäiriöitä kuten kohtauksia, halvaus tai vapinaa. Vaikka neuropatia onkin tärkeä neurotoksisuuden ilmenemismuoto, nykyään on selvää, että hermostoon kohdistuvaan toksisuuteen liittyy monia muitakin oireita (esimerkiksi motorisen koordinaation puute, aistitoiminnan vajaukset, oppimis- ja muistihäiriöt), jotka eivät ilmene neuropatiaan liittyvissä tai muun tyyppisissä tutkimuksissa.

Tämän neurotoksisuuden testimenetelmän tarkoituksena on saada selville tärkeimmät hermostoperäiset käyttäytymiseen kohdistuvat ja neuropatologiset vaikutukset täysikasvuisilla jyrsijöillä. Vaikka morfologisia muutoksia ei esiintyisi, vaikutukset käyttäytymiseen voivat ilmentää elimistöön kohdistuvaa haitallista vaikutusta. Kaikki käyttäytymismuutokset eivät kuitenkaan ole nimenomaan hermostoperäisiä. Siksi kaikkia havaittuja muutoksia on arvioitava vastaavien histopatologisten, hematologisten tai biokemiallisten sekä muun tyyppiseen systeemiseen toksisuuteen liittyvien tietojen perusteella. Tässä menetelmässä neurotoksisten vasteiden kuvaamiseksi ja kvantifioimiseksi tehtäviin testeihin kuuluu erityisiä histopatologisia ja käyttäytymiseen liittyviä testejä. Niiden lisätukena voidaan käyttää sähköfysiologisia ja/tai biokemiallisia tutkimuksia (1)(2)(3)(4).

Neurotoksiset aineet voivat vaikuttaa monin tavoin useisiin kohteisiin hermostossa. Koska yhdelläkään koesarjalla ei voida täysin arvioida kaikkien aineiden mahdollista neurotoksisuutta, saatetaan tarvita muita *in vivo* tai *in vitro* -testejä, jotka on erityisesti tarkoitettu havaitun tai ennakoidun neurotoksisuustyypin tutkimiseen.

Soveltamalla yhdessä neurotoksisuuden testistrategioita ja -menetelmiä koskevan OECD:n ohjeasiakirjan (1) ohjeita ja tätä testimenetelmää voidaan myös suunnitella tutkimuksia, joiden tarkoituksena on kuvata tarkemmin annosvasteen kvantifiointia ja lisätä sen herkkyyttä. Näin voidaan paremmin arvioida haitaton vaikutustaso (no-observed-adverse effect level, NOAEL) tai osoittaa kemikaalin tiedetyt tai epäillyt haittavaikutukset. Voidaan esimerkiksi suunnitella tutkimuksia, joilla tunnistetaan ja arvioidaan neurotoksisuusmekanismeja tai täydennetään tietoja, joita on jo saatu käyttämällä tavanomaisia hermostoperäisiin käyttäytymisoireisiin kohdistuvia ja neuropatologisia havainnointimenetelmiä. Tällaisissa tutkimuksissa ei tarvitse yrittää hankkia tietoja, jotka saataisiin jo tässä menetelmässä suositelluilla tavanomaisilla kokeilla, mikäli nämä tiedot ovat jo saatavilla eikä niitä pidetä välttämättöminä tutkimustulosten tulkinnan kannalta.

Käytettäessä tätä neurotoksisuustutkimusta yksin tai yhdessä jonkin muun tutkimuksen kanssa saadaan tietoja, joiden avulla voidaan

— todeta, onko testattu kemikaali vahingoittanut hermostoa pysyvästi, vai ovatko vauriot palautuvia

— kuvata kemikaalialtistumiseen liittyviä hermostonmuutoksia ja ymmärtää niiden taustalla olevia mekanismeja

▼B

— määritellä annos-vaste- ja aika-vaste-suhteet haitattoman vaikutustason arvioimiseksi (jota voidaan käyttää kemikaalin turvallisuuskriteerien määrittelemisessä).

Tässä testimenetelmässä testiaine annostellaan suun kautta. Muut antotiet (esimerkiksi ihon kautta tai inhalaationa) voivat olla sopivampia ja edellyttää suorituksen yksityiskohtien muuttamista. Antotavan valintaan vaikuttavat ihmisen altistusominaisuudet ja saatavilla olevat toksikologiset tai kineettiset tiedot.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Haittavaikutus: sellainen käsittelyyn liittyvä poikkeama perustasosta, joka vähentää organismin kykyä pysyä hengissä, lisääntyä tai sopeutua ympäristöön.

Annos: annettavan testiaineen määrä. Annos ilmaistaan painoyksikköinä (g, mg) tai testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esimerkiksi mg/kg) tai vakiopitoisuuksina ravinnossa (ppm).

Annostus: yleistermi, joka käsittää annoksen, annostusvälit ja annostelun keston.

Neurotoksisuus: kemikaalille tai biologiselle tai fysikaaliselle aineelle altistumisesta aiheutuva haitallinen muutos hermoston rakenteessa tai toiminnassa.

Neurotoksinen aine: kemikaali tai biologinen tai fysikaalinen aine, joka voi aiheuttaa neurotoksisuutta.

NOAEL: (lyhenne sanoista no-observed-adverse effect level). Korkein annostaso, jolla ei havaita käsittelyyn liittyviä haitallisia löydöksiä.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testattavaa kemikaalia annostellaan suun kautta erilaisina annoksina useille koe-eläinryhmille, jotka ovat laboratoriokokeissa käytettäviä jyrsijöitä. Tavallisesti käytetään toistuvaa annostusta. Annosteluohjelma voi kestää 28 päivää, 90 päivää (subkrooninen) tai yhden vuoden tai pidempään (krooninen). Tässä testimenetelmässä esitettyjä menettelyjä voidaan käyttää myös akuutin neurotoksisuuden tutkimuksessa. Eläimiä testataan käyttäytymiseen ja/tai hermostoon liittyvien poikkeavuuksien selvittämiseksi tai niiden kuvaamiseksi. Jokaisen havainnointijakson aikana arvioidaan monentyyppisiä käyttäytymisilmiöitä, johon neurotoksiset aineet voivat vaikuttaa. Testin lopussa osalle eläimistä (kaikista ryhmistä, kummastakin sukupuolesta) tehdään perfuusio *in situ,* ja aivoista, selkäytimestä ja ääreishermostosta preparoidaan leikkeitä, jotka tutkitaan.

Kun tutkimus suoritetaan erillisenä tutkimuksena neurotoksisuuden seulomiseksi tai neurotoksisten vaikutusten kuvaamiseksi, voidaan kustakin ryhmästä ne eläimet, joita ei käytetä perfuusioon tai myöhempiin histopatologisiin tutkimuksiin (katso taulukko 1), käyttää erityisiin hermostoperäisiin käyttäytymisoireisiin liittyviin, neuropatologisiin, neurokemiallisiin tai sähköfysiologisiin tutkimuksiin. Näillä tutkimuksilla täydennetään tämän menetelmän perustutkimuksa (1). Täydentävät tutkimukset voivat olla erityisen hyödyllisiä, kun empiiriset havainnot tai ennakoidut vaikutukset osoittavat kemikaalin neurotoksisuuden olevan tietyn tyyppistä, tai että sillä on erityinen kohde. Vaihtoehtoisesti jäljelle jääneet eläimet voidaan käyttää arviointeihin, joita edellytetään jyrsijöillä tehtävien toistuvan annostelun toksisuustutkimusten tutkimusmenetelmissä.

▼B

Kun tämän testimenetelmän menettelyt yhdistetään muiden testimenetelmien menettelyihin, on käytettävä riittävää määrää eläimiä, jotta molempien tutkimusten havainnointiin liittyvät vaatimukset voidaan täyttää.

1.4 MENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Eläinlajin valinta**

Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, tosin muitakin jyrsijöitä voidaan käyttää, mikäli se on perusteltua. Testiin on käytettävä nuoria, täysikasvuisia ja terveitä eläimiä, jotka edustavat yleisesti käytettyjä koe-eläinkantoja. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä kantavia. Annostelu aloitetaan yleensä mahdollisimman pian vieroituksen jälkeen, mieluiten eläinten ollessa kuuden viikon ikäisiä, ja joka tapauksessa ennen kuin ne ovat yhdeksän viikon ikäisiä. Kun tämä tutkimus yhdistetään muihin tutkimuksiin, ikävaatimusta saatetaan joutua mukauttamaan. Käytettyjen eläinten paino saa tutkimuksen alussa vaihdella korkeintaan + 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta. Kun lyhytaikaista toistuvan annostelun tutkimusta seuraa pitkäaikaistutkimus, on molemmissa tutkimuksissa käytettävä samasta kannasta ja samasta lähteestä olevia eläimiä.

1.4.2 **Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta**

Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (+ 3 °C). Vaikka riittävät vaatimukset suhteellisen kosteuden suhteen ovat vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Pitäisi välttää äkkinäisiä kovia ääniä. Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratoriorehua, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Rehun valintaan voi vaikuttaa se, miten testiaine voidaan sekoittaa rehuun tällä menetelmällä annosteltaessa. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä.

1.4.3 **Eläinten valmistelu**

Nuoret, terveet eläimet jaetaan satunnaisotannalla testi- ja verrokkiryhmiin. Häkit tulee järjestää siten, että niiden sijoittamisesta mahdollisesti aiheutuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet merkitään yksilöllisesti ja pidetään häkeissään vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-oloihin.

1.4.4 **Antotie ja annosten valmistelu**

Tutkimusmenetelmässä edellytetään nimenomaan testiaineen annostelua suun kautta. Suun kautta annostelu voi tapahtua letkuruokinnalla, rehun tai juomaveden mukana tai kapseleina. Muita antotapoja (esimerkiksi ihon kautta tai inhalaationa) voidaan käyttää, mutta suoritustapaa saatetaan joutua muuttamaan. Antotavan valintaan vaikuttavat ihmisen altistusominaisuudet sekä saatavilla olevat toksikologiset ja kineettiset tiedot. Antotien valintaperusteet sekä siitä tämän testimenetelmän suoritukseen aiheutuvat muutokset on ilmoitettava.

▼B

Testiaine liuotetaan tai suspensoidaan tarvittaessa sopivaan kantaja-aineeseen. Suositusten mukaan ensin tulee käyttää vesipohjaista liuosta/suspensiota, sitten öljypohjaista (esimerkiksi maissiöljy) liuosta/suspensiota ja vasta sitten mahdollisesti muuhun kantaja-aineeseen pohjautuvaa liuosta/suspensiota. Kantaja-aineen toksiset ominaisuudet on tunnettava. Lisäksi on kiinnitettävä huomiota seuraaviin kantaja-aineen ominaisuuksiin: kantaja-aineen vaikutukset testiaineen imeytymiseen, jakautumiseen, metaboloitumiseen ja elimistössä säilymiseen. Edellä mainitut tekijät voivat vaikuttaa testiaineen toksisiin ominaisuuksiin. Lisäksi on otettava huomioon kantaja-aineen vaikutus eläinten ravinnon ja veden kulutukseen sekä niiden ravitsemustilaan.

1.5 TESTIN SUORITUS

1.5.1 **Eläinten määrä ja sukupuoli**

Kun tutkimus suoritetaan erillisenä tutkimuksena, on kunkin annoksen testaamiseen sekä verrokkiryhmään, jolla arvioidaan yksityiskohtaisia kliinisiä ja toiminnallisia havaintoja, käytettävä vähintään 20 eläintä (10 naarasta ja 10 urosta). Ainakin viidelle urokselle ja viidelle naaraalle näistä kymmenestä uroksesta ja kymmenestä naaraasta on tehtävä perfuusio *in situ,* ja niitä on käytettävä yksityiskohtaisiin neurohistopatologisiin tutkimuksiin tutkimuksen lopussa. Silloin, kun tietystä annosryhmästä havainnoidaan vain muutamia eläimiä neurotoksisten vaikutusten osoittamiseksi, nämä eläimet olisi mahdollisesti otettava perfuusioon valittujen eläinten joukkoon. Kun tutkimus suoritetaan yhdessä toistuvan annostelun toksisuustutkimuksen kanssa, on käytettävä riittävästi eläimiä molempien tutkimusten tavoitteiden saavuttamiseksi. Taulukossa 1 on esitetty eläinten vähimmäismäärät ryhmää kohti useissa tutkimusyhdistelmissä. Jos osa eläimistä aiotaan lopettaa kesken tutkimuksen tai suunnitellaan toipuvista eläimistä koostuvia ryhmiä toksisten vaikutusten palautuvuuden, jatkuvuuden ja ilmenemisen viivästymisen havainnoimiseksi testin jälkeen tai harkitaan täydentävien havaintojen tekemistä, eläinten määrää on lisättävä. Näin varmistetaan, että saatavilla on tarvittava määrä eläimiä havainnointia ja histopatologisia tutkimuksia varten.

1.5.2 **Testiryhmä ja verrokkiryhmä**

Yleensä käytetään vähintään kolmea annosryhmää ja yhtä verrokkiryhmää. Jos vaikutuksia ei muiden tietojen arvioinnin perusteella ole odotettavissa toistetulla vuorokausiannoksella 1 000 mg/kg, voidaan tehdä raja-annostesti. Jos sopivia tietoja ei ole saatavilla, voidaan tehdä annosalueen haarukointitesti käytettävien annosten määrittämisen helpottamiseksi. Testiaineen annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmän eläimiä. Jos testiaineen annostelussa käytetään kantaja-ainetta, sitä tulee antaa verrokkiryhmälle suurin käytetty määrä.

1.5.3 **Luotettavuuden tarkistus**

Tutkimuksen suorittavan laboratorion on esitettävä tiedot, joista ilmenevät sen kyky suorittaa tutkimus sekä käytettyjen menetelmien herkkyys. Näistä tiedoista tulisi ilmetä kyky osoittaa ja kvantifioida muutokset päätepisteissä, joiden havainnointia suositellaan. Näitä ovat autonomiset oireet, aistien reaktiivisuus, tarttumaotteen voimakkuus ja motorinen aktiivisuus. Viitteissä 2–9 on tietoja eri tyyppisiä neurotoksisia vasteita aiheuttavista kemikaaleista, joita voidaan käyttää positiivisina kontrolliaineina. Aiemmin saatuja tietoja voidaan käyttää, jos koemenetelmien oleelliset osatekijät pysyvät ennallaan. Aiempien tietojen ajoittaista päivitystä suositellaan. Menetelmien herkkyyden säilymistä osoittavia uusia tietoja on tuotettava, kun testin suorittava laboratorio muuttaa jonkin testin toimenpiteiden suorittamisen kannalta olennaisen tekijän.

▼B

1.5.4 **Annoksen valinta**

Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon kaikki testattavasta yhdisteestä tai sen sukulaisaineista saatavilla olevat aiemmin saadut toksisuus- ja kinetiikkatiedot. Korkein annostaso tulee valita siten, että sen tarkoituksena on aiheuttaa neurotoksisia vaikutuksia tai selviä systeemisen toksisuuden vaikutuksia. Tämän jälkeen annostasot valitaan asteittain alenevasti mahdollisen annosvasteen osoittamiseksi ja haitattoman vaikutustason (NOAEL) osoittamiseksi alhaisimmalla annostasolla. Periaatteessa annostasot tulee määrätä siten, että ensisijaiset hermostoon kohdistuvat toksiset vaikutukset voidaan erottaa systeemiseen toksisuuteen liittyvistä vaikutuksista. Kaksi tai kolme eri suuruista annosta on yleensä ihanteellisin määrä, ja usein on suositeltavaa käyttää neljättä testiryhmää erittäin pitkien annosvälien sijaan (esimerkiksi kerroin yli 10). Jos ihmisen altistumisesta on olemassa järkevä arvio, se on otettava huomioon.

1.5.5 **Raja-annostesti**

Jos tutkimus yhdellä annostasolla (vähintään 1 000 mg/kg/vrk) ei tässä kuvatulla suoritustavalla aiheuta havaittavia neurotoksisia vaikutuksia ja jos toksisuus ei ole todennäköistä rakenteellisesti samanlaisista yhdisteistä saatujen tietojen perusteella, täydellinen tutkimus kolmella annostasolla ei välttämättä ole tarpeen. Odotettavissa olevan ihmisen altistuksen perusteella raja-annostestissä on mahdollisesti käytettävä korkeampaa annostasoa suun kautta annettuna. Muiden antotapojen kuten inhalaation tai ihoapplikaation osalta korkein saavutettavissa oleva altistumistaso määräytyy yleensä testiaineen fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien perusteella. Akuutin oraalisen tutkimuksen tekemiseksi raja-annostestin annoksen tulee olla vähintään 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Annostelu**

Eläimille annetaan testiainetta päivittäin seitsemänä päivänä viikossa vähintään 28 päivän ajan. Viisipäiväisen annosteluohjelman käyttö tai lyhyempi altistusaika on perusteltava. Letkuruokinnassa testiaine on annettava yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Kerralla annettavan nesteen enimmäismäärä riippuu koe-eläinten koosta. Määrä ei saa olla yli 1 ml sataa painogrammaa kohti. Vesiliuoksia voidaan kuitenkin antaa 2 ml:aan asti sataa painogrammaa kohti. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat korkeammilla pitoisuuksilla, testiainemäärän vaihtelu olisi minimoitava säätämällä pitoisuuksia vakiotilavuuden takaamiseksi kaikilla annostasoilla.

Jos aineita annetaan eläimille rehuun tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, etteivät testiainemäärät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Kun testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna, sen määrä mitataan joko vakiopitoisuutena rehussa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettuna vakioannostasona. Käytetty tapa pitää mainita. Jos testiaine annetaan letkulla, annos tulee antaa joka päivä samaan aikaan, ja annosta on mukautettava tarvittaessa siten, että annostaso pysyy samana eläimen painoon nähden. Kun toistuvan annostelun tutkimuksen jälkeen tehdään pitkäaikaistutkimus, eläimille on annettava samanlaista ravintoa molemmissa tutkimuksissa. Jos kerta-annos ei akuutissa tutkimuksessa ole mahdollinen, annos voidaan antaa pienemmissä osissa vuorokauden kuluessa.

▼B

1.6 HAVAINNOINTI

1.6.1 **Havainnoinnin ja testien määrä**

Toistuvan annostelun tutkimuksissa havainnointijakson tulee kattaa annostelujakso. Akuuteissa tutkimuksissa havaintoja on tehtävä käsittelyn jälkeen 14 päivän aikana. Satelliittiryhmien eläimiä, joita ei altisteta käsittelyn jälkeisen jakson aikana, on myös havainnoitava tällä jaksolla.

Havaintoja on tehtävä riittävän usein, jotta kaikki käyttäytymiseen liittyvät ja/tai hermostolliset poikkeavuudet voitaisiin havaita. Havainnot on mieluiten tehtävä samoihin aikoihin joka päivä ja ottaen huomioon, milloin odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten. Kliinisten havaintojen ja toiminnallisten kokeiden aikataulu (taajuus) on esitetty yhteenvetona taulukossa 2. Jos aikaisemmista tutkimuksista saadut kineettiset tai muut tiedot osoittavat, että havainnoinnin, testien tai havainnoinnin jälkeisten jaksojen ajankohtaa on muutettava, on laadittava uusi aikataulu tiedonsaannin maksimoimiseksi. Aikatauluun tehtävät muutokset on perusteltava.

1.6.1.1 *Havainnot yleisestä terveydentilasta ja kuolleisuudesta/-sairastavuudesta*

Kaikkien eläinten terveydentilaa on havainnoitava tarkoin vähintään kerran päivässä, ja niiden sairastavuutta tai kuolleisuutta vähintään kahdesti päivässä.

1.6.1.2 *Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot*

Kaikista tätä tarkoitusta varten valituista eläimistä on tehtävä yksityiskohtaisia kliinisiä havaintoja (katso taulukko 1) kerran ennen ensimmäistä altistuskertaa (samaa koe-eläintä koskevia vertailuja varten) ja eri väliajoin sen jälkeen tutkimuksen kestosta riippuen (katso taulukko 2). Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot toipuvien eläinten satelliittiryhmistä on tehtävä toipumisjakson lopussa. Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot on tehtävä eläimen oman häkin ulkopuolella vakioalueella. Havainnot on kirjattava tarkasti käyttämällä pisteytysjärjestelmiä, joihin sisältyvät kriteerit tai pisteytysasteikot jokaista havainnointiin kuuluvaa mittausta varten. Testilaboratorion on määriteltävä käytetyt kriteerit ja asteikot tarkasti. On pyrittävä varmistamaan, että testiolosuhteet (jotka eivät liity järjestelmällisesti käsittelyyn) vaihtelevat mahdollisimman vähän, ja että havainnoinnin suorittavat eläinten käsittelystä tietämättömät koulutetut havainnoijat.

On suositeltavaa, että havainnointi toteutetaan suunnitelmallisesti siten, että tarkoin määriteltyjä kriteereitä (mukaan lukien normaalit ”vaihtelun rajat”) sovelletaan järjestelmällisesti kuhunkin eläimeen jokaisen havainnointiajankohdan aikana. ”Normaalit vaihtelun rajat” on dokumentoitava tarkoituksenmukaisesti. Kaikki havaitut oireet on kirjattava. Myös havaittujen oireiden voimakkuus on kirjattava mahdollisuuksien mukaan. Kliinisiä havaintoja on tehtävä muun muassa ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, mahdollisten eritteiden erityksen sekä autonomisen hermoston toiminnan (esimerkiksi kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, poikkeavuudet hengityksessä ja/tai ilman haukkominen, kaikki virtsaamiseen tai ulostamiseen liittyvät epätavalliset oireet sekä virtsan värjäytyminen) muutoksista.

▼B

Myös kaikki kehon asentoon, aktiivisuustasoon (esimerkiksi vakioalueen vähentynyt tai lisääntynyt tutkiminen) ja liikekoordinaatioon liittyvät epätavalliset vasteet on kirjattava. Muutokset käynnissä (esimerkiksi vaappuminen ja ataksia), asennossa (esimerkiksi selän köyristäminen) ja käsittelyyn, paikkaan tai muihin ympäristön ärsykkeisiin liittyvässä reaktiivisuudessa sekä klooniset tai tooniset liikkeet, kouristukset tai vapina, stereotypiat (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, epätavalliset pään liikkeet, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esimerkiksi pureminen tai ylenmääräinen nuoleminen, itsensä silpominen, takaperin käveleminen, ääntely) tai aggressiivisuus on kirjattava.

1.6.1.3 *Toiminnalliset kokeet*

Yksityiskohtaisten kliinisten havaintojen tavoin myös toiminnallisia kokeita on tehtävä kerran ennen altistusta ja useasti sen jälkeen kaikilla tätä tarkoitusta varten valituilla eläimillä (katso taulukko 1). Myös toiminnallisten kokeiden lukumäärä riippuu tutkimuksen kestosta (katso taulukko 2). Taulukossa 2 esitettyjen havainnointijaksojen lisäksi toipuvien eläinten muodostamista satelliittiryhmistä on tehtävä toiminnallisia havaintoja mahdollisimman lähellä eläinten lopettamisajankohtaa. Toiminnallisissa kokeissa testataan aistien reaktiivisuutta erilaisille ärsykkeille (esimerkiksi kuulo, näkö ja asentotunto (5)(6)(7)), arvioidaan tarttumaotteen voimakkuutta (S) ja motorista toimintaa (9). Motorista toimintaa on mitattava automaattilaitteella, jolla voidaan selvittää sekä toiminnan väheneminen että lisääntyminen. Jos käytetään jotakin muuta määriteltyä järjestelmää, sen on oltava kvantitatiivinen, ja sen herkkyys ja luotettavuus on osoitettava. Kaikki laitteet on testattava sen varmistamiseksi, että laitteet ovat luotettavia koko tutkimuksen ajan ja ja antavat toistettavia tuloksia. Lisätietoja sopivista suoritustavoista on esitetty viitteissä. Jos ei ole saatavissa tietoja, jotka viittaisivat mahdollisiin neurotoksisiin vaikutuksiin (esimerkiksi rakenne-aktiivisuus-tiedot, epidemiologiset tiedot, muut toksikologiset tutkimukset), on harkittava aistitoiminnan ja motorisen toiminnan sekä oppimisen ja muistin testaamiseen erityistestien tekemistä mahdollisten vaikutusten tutkimiseksi tarkemmin. Lisätietoja erityistesteistä ja niiden käytöstä on esitetty viitteessä (1).

Eläimet, joissa ilmenee toksisuuden oireita siinä määrin, että se häiritsisi merkittävästi toiminnallisten kokeiden suorittamista, voidaan poistaa kyseisestä kokeesta. Eläinten poistaminen toiminnallisesta kokeesta on perusteltava.

1.6.2 **Ruumiinpaino ja ravinnon/veden kulutus**

Korkeintaan 90 päivää kestävissä tutkimuksissa eläimet on punnittava vähintään kerran viikossa, ja ravinnon kulutus (veden kulutus, jos testiaine annetaan veteen sekoitettuna) on mitattava vähintään viikoittain. Pitkäaikaistutkimuksissa kaikki eläimet on punnittava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran neljässä viikossa. Ravinnon kulutus (veden kulutus, jos testiaine annetaan veteen sekoitettuna) on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen noin kolmen kuukauden välein, elleivät muutokset terveydentilassa tai ruumiinpainossa muuta edellytä.

▼B

1.6.3 **Silmätutkimukset**

Yli 28 päivää kestävissä tutkimuksissa on tehtävä silmätutkimus oftalmoskoopilla tai vastaavalla sopivalla välineellä ennen testiaineen annostelua ja tutkimuksen päättyessä mieluiten kaikille eläimille, mutta ainakin korkean annostason ryhmän ja verrokkiryhmän eläimille. Jos silmistä löydetään muutoksia tai jos se on kliinisten oireiden vuoksi tarpeen, kaikki eläimet on tutkittava. Pitkäaikaistutkimuksissa silmätutkimus on tehtävä myös 13. viikolla. Silmätutkimuksia ei tarvitse tehdä, jos tiedot ovat jo saatavissa muista saman pituisista ja samalla annostasolla tehdyistä tutkimuksista.

1.6.4 **Hematologia ja kliininen biokemia**

Kun neurotoksisuustutkimus tehdään toistuvan annostelun systeemisen toksisuuden tutkimuksen yhteydessä, verikokeet ja kliiniset biokemialliset määritykset on tehtävä systeemisen toksisuuden tutkimusmenetelmässä esitetyllä tavalla. Näytteiden kerääminen on tehtävä siten, että mahdolliset vaikutukset hermostoperäiseen käyttäytymiseen minimoidaan.

1.6.5 **Histopatologia**

Neuropatologinen tutkimus on suunniteltava täydentämään ja laajentamaan tutkimuksen *in vivo* -vaiheen aikana tehtyjä havaintoja. Näytteet vähintään viiden eläimen kudoksista sukupuolta ja ryhmää kohti (katso taulukko 1 ja seuraava kappale) on kiinnitettävä *in situ* käyttämällä yleisesti hyväksyttyjä perfuusio- ja kiinnitystekniikoita (katso viite 3, luku 5 ja viite 4, luku 50). Kaikki havaittavat suuret muutokset on kirjattava. Kun tutkimus suoritetaan yksittäisenä neurotoksisuuden seulontatutkimuksena tai neurotoksisten vaikutusten kuvaamiseksi, jäljelle jääneet eläimet voidaan käyttää joko erityisiin hermostoperäiseen käyttäytymiseen liittyviin (10) (11), neuropatologisiin (10) (11) (12) (13), neurokemiallisiin (10) (11) (14) (15) tai sähköfysiologisiin (10) (11) (16) (17) tutkimuksiin, jotka voivat täydentää tässä kuvattuja toimenpiteitä ja tutkimuksia. Nämä eläimet voidaan myös käyttää histopatologisiin tutkimuksiin. Täydentävät toimenpiteet ovat erityisen hyödyllisiä, kun empiiriset havainnot tai odotetut vaikutukset viittaavat tietyn tyyppiseen tai tiettyyn kohteeseen vaikuttavaan neurotoksisuuteen (2) (3). Vaihtoehtoisesti jäljelle jääneet eläimet voidaan käyttää toistuvan annostelun testimenetelmässä kuvattuihin tavanomaisiin patologisiin arviointeihin.

Kaikki parafiiniin valetut kudosnäytteet on värjättävä yleisellä värjäysmenetelmällä kuten hematoksyliini-eosiini-menetelmällä (H&E), ja ne on tutkittava mikroskooppisesti. Jos havaitaan tai epäillään merkkejä ääreishermoston neuropatiasta, on tutkittava muoviin valettuja ääreishermoston kudosnäytteitä. Myös kliiniset oireet voivat antaa aihetta uusien kohteiden tutkimiseen tai erityisten värjäysmenetelmien käyttämiseen. Viitteissä (3) ja (4) on annettu ohjeita lisätutkimuksen kohteista. Myös sopivat erikoisvärit voivat olla hyödyllisiä tietyn tyyppisten patologisten muutosten osoittamiseksi (18).

▼B

Keskus- ja ääreishermostosta otettuja edustavia leikkeitä on tutkittava histologisesti (katso viite 3, luku 5 ja viite 4, luku 50). Yleensä on tutkittava seuraavat alueet: etuaivot, isojen aivojen keskiosa mukaan luettuna aivoturson läpi menevä leike, keskiaivot, pikkuaivot, aivosilta, ydinjatke, silmä näköhermo ja verkkokalvo mukaan luettuna, selkäydin kaularangan ja lannerangan kohdalta, takajuuren hermosolmu, taka- ja etujuuren hermosäikeet, proksimaalinen lonkkahermo, proksimaalinen säärihermo (polven kohdalta) ja säärihermon puoleiset pohjelihaksen haarat. Selkäytimestä ja ääreishermostosta on tehtävä sekä poikittais- että pitkittäisleikkeet. Hermoston verisuonistoon on kiinnitettävä huomiota. Lisäksi on tutkittava luurankolihaksesta, erityisesti pohjelihaksesta otettu näyte. Erityistä huomiota on kiinnitettävä keskus- ja ääreishermoston alueisiin, joiden solu- ja säierakenteeseen sekä -tyyppiin neurotoksisen aineen tiedetään vaikuttavan erityisen haitallisesti.

Viitteissä (3) ja (4) on annettu ohjeita neuropatologisista muutoksista, joita toksisille aineille altistuminen yleisesti aiheuttaa. Kudosnäytteet on suositeltavaa tutkia vaiheittain siten, että korkean annostason ryhmästä otettuja leikkeitä verrataan aluksi verrokkiryhmästä otettuihin leikkeisiin. Jos näiden ryhmien näytteissä ei havaita neuropatologisia muutoksia, myöhempää analyysia ei tarvita. Jos korkean annoksen ryhmässä havaitaan neuropatologisia muutoksia, on keskisuuren ja pienen annoksen ryhmän kustakin mahdollisesti vahingoittuneesta kudoksesta otettava näytteet, jotka on koodattava ja tutkittava järjestyksessä.

Jos kvalitatiivisessa tutkimuksessa löydetään näyttöä neuropatologisista muutoksista, on tehtävä lisätutkimus niille hermoston alueille, joissa näitä muutoksia esiintyy. Kaikkien annosryhmien mahdollisesti vahingoittuneista alueista on otettava leikkeitä, jotka on koodattava ja tutkittava satunnaisotannalla niiden koodia tietämättä. Kaikkien vaurioiden määrä ja vaikeusaste on kirjattava. Kun kaikki alueet kaikista annosryhmistä on arvioitu, voidaan koodi paljastaa ja tehdä tilastollinen analyysi annosvasteiden suhteen arvioimiseksi. Kunkin vaurion eri vaikeusasteista on kuvailtava esimerkkejä.

Neuropatologiset löydökset on arvioitava yhdessä käyttäytymiseen liittyvien havaintojen ja mittausten sekä muista testiaineella tehdyistä edeltävistä ja samanaikaisista systeemisen toksisuuden tutkimuksista saatujen tietojen kanssa.

2. TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tuloksina on esitettävä yksittäisiä eläimiä koskevat tulokset. Kaikki tulokset tulee esittää myös yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin testi- ja verrokkiryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä kokeen alussa, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä sekä niiden kuolinajankohta, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen toksisten vaikutusten kuvaus mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto, tyyppi ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten määrä mukaan lukien vaurioiden tyyppi ja vaikeusaste.

▼B

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Tutkimuksessa on arvioitava hermostoperäiseen käyttäytymiseen kohdistuvien ja neuropatologisten vaikutusten esiintyvyys, vaikeusaste ja korrelaatio (myös neurokemialliset tai sähköfysiologiset vaikutukset, jos on tehty täydentäviä tutkimuksia) sekä muut havaitut haittavaikutukset. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Tilastolliset menetelmät on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 LOPPURAPORTTI

Loppuraportissa on annettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto (isomeria, puhtausaste ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet mukaan luettuina)

— tunnistetiedot.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji- ja kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— lähde, yllöpito-olosuhteet, totuttamisvaihe, ravinto jne.,

— kunkin eläimen paino kokeen alussa.

Koeolosuhteet:

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta/rehuvalmisteesta, valmisteessa olleesta pitoisuudesta, valmisteen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

— annosteltujen annosten erittely, mukaan luettuna yksityiskohtaiset tiedot kantaja-aineesta ja annostellun aineen määrästä ja fysikaalisesta muodosta

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen annostelusta

— annostasojen valintaperusteet

— altistustavan ja altistuksen keston valintaperusteet

— rehussa/juomavedessä olevan testiaineen määrän (ppm) muuntaminen varsinaiseksi annokseksi (mg/kg/vrk) tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta.

Havainnointi ja testausmenetelmät:

— yksityiskohtaiset tiedot kunkin ryhmän eläinten jakamisesta alaryhmiin perfuusiota varten

— yksityiskohtaiset tiedot pisteytysjärjestelmistä, mukaan luettuna valintaperusteet ja kunkin mittauksen pisteytysasteikot yksityiskohtaisten kliinisten havaintojen yhteydessä

▼B

— yksityiskohtaiset tiedot toiminnallisista kokeista, joissa testataan aistien reaktiivisuutta erilaisille ärsykkeille (esimerkiksi kuulo, näkö ja asentotunto), arvioidaan tarttumaotteen voimakkuutta ja motorista aktiivisuutta (mukaan luettuna yksityiskohtaiset tiedot aktiivisuuden tutkimiseksi käytettävistä automaattilaitteista) sekä muista käytetyistä menetelmistä

— yksityiskohtaiset tiedot silmätutkimuksista sekä tarvittaessa verikokeista ja kliinisistä biokemiallisista kokeista ja niihin liittyvistä lähtötasoarvoista

— yksityiskohtaiset tiedot erityisistä hermostoperäiseen käyttäytymiseen liittyvistä, neuropatologisista, neurokemiallisista ja sähköfysiologisista menetelmistä.

Tulokset:

— ruumiinpaino/ruumiinpainon muutokset mukaan lukien ruumiinpaino lopetettaessa

— ravinnon ja veden kulutus tarvittaessa

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, toksisuusoireet tai kuolleisuus mukaan lukien

— yksityiskohtaisten kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (alkamishetki ja jatkokehitys) palautuvuudesta riippumatta

— yksityiskohtainen kuvaus kaikkien toiminnallisten kokeiden tuloksista

— ruumiinavauslöydökset

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista hermostoperäiseen käyttäytymiseen liittyvistä, neuropatologisista ja neurokemiallisista tai sähköfysiologisista löydöksistä, mikäli saatavissa

— tiedot imeytymisestä ja metaboliasta, mikäli saatavissa

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten tarkastelu:

— annos-vaste-tulokset

— muiden toksisten vaikutusten yhteys testatun kemikaalin mahdollisesta neurotoksisuudesta tehtyihin johtopäätöksiin

— haitaton vaikutustaso (NOAEL).

Johtopäätökset:

— erityistä lausuntoa testatun kemikaalin yleisestä neurotoksisuudesta suositellaan.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, valmisteilla.

2. Test Guidline for a Developmental Neurotoxicitu Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Valmisteilla.

3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

5. Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999–1003.

6. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691–704.

7. Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267–283.

8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233–236.

9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for NeurotoxicologicalAssessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599–609.

10. Tilson, H.A., and Mitchell, CL. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11. Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12. Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689–695.

13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343–352.

14. O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445–452.

15. O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368–378.

16. Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299–335.

17. Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/London, pp. 726–742.

18. Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Taulukko 1

Eläinten vähimmäismäärä ryhmää kohti kun neurotoksisuustutkimus tehdään erikseen tai muiden tutkimusten yhteydessä

	NEUROTOKSISUUSTUTKIMUKSEN TYYPPI:			
	Erillinen tutkimus	28-päiväisen tutkimuksen yhteydessä	90-päiväisen tutkimuksen yhteydessä	Kroonisen toksisuustutkimuksen yhteydessä
Eläinten kokonaismäärä ryhmää kohti	10 urosta ja 10 naarasta	10 urosta ja 10 naarasta	15 urosta ja 15 naarasta	25 urosta ja 25 naarasta
Toiminnallisiin kokeisiin ja yksityiskohtaiseen kliiniseen havainnointiin valittujen eläinten lukumäärä	10 urosta ja 10 naarasta	10 urosta ja 10 naarasta	10 urosta ja 10 naarasta	10 urosta ja 10 naarasta
In situ -perfuusioon ja neurohistopatologisiin tutkimuksiin valittujen eläinten lukumäärä	5 urosta ja 5 naarasta	5 urosta ja 5 naarasta	5 urosta ja 5 naarasta	5 urosta ja 5 naarasta
Toistuvan annostelun/subkroonisen/kroo-nisen toksisuuden havainnointiin, hematologian, kliinisen biokemian ja histopatologian kokeisiin jne. valittujen eläinten lukumäärä vastaavien *ohjeasiakirjojen* mukaisesti		5 urosta ja 5 naarasta	10 urosta † ja 10 naarasta †	20 urosta † ja 20 naarasta †
Täydentävät havainnot tarvittaessa	5 urosta ja 5 naarasta			

† Tähän ryhmään kuuluu viisi eläintä, jotka on valittu toiminnallisiin kokeisiin ja yksityiskohtaiseen kliiniseen havainnointiin osana neurotoksisuustutkimusta

▼B

Taulukko 2

Kliinisten havaintojen ja toiminnallisten kokeiden taajuus

Havaintotyyppi		Tutkimuksen kesto			
		Akuutti	28-päiväinen	90-päiväinen	Krooninen
Kaikille eläimille	Yleinen terveydentila	päivittäin	päivittäin	päivittäin	päivittäin
	Kuolleisuus/sairas- tavuus	kahdesti päivässä	kahdesti päivässä	kahdesti päivässä	kahdesti päivässä
Toiminnallisiin havaintoihin valituille eläimille	Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — 8 tunnin kuluessa annostelusta ajankohtana, jolloin vaikutuksia on arvioitu esiintyvän eniten — 7. ja 14. päivänä annostelun jälkeen	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — sen jälkeen viikoittain	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — kerran ensimmäisen tai toisen altistusviikon aikana — sen jälkeen kuukausittain r	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — kerran ensimmäisen altistuskuukauden lopussa — sen jälkeen joka kolmas kuukausi
	Toiminnalliset kokeet	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — 8 tunnin kuluessa annostelusta ajankohtana, jolloin vaikutuksia on arvioitu esiintyvän eniten — 7. ja 14. päivänä annostelun jälkeen	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — kokeen neljännen viikon aikana mahdollisimman lähellä altistamisen päättymistä	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — kerran ensimmäisen tai toisen altistusviikon aikana — sen jälkeen kuukausittain	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — kerran ensimmäisen altistuskuukauden — sen jälkeen joka kolmas kuukausi

▼B

B.44. **IHON KAUTTA IMEYTYMINEN: *IN VIVO* -MENETELMÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro TG 427 (2004)

1.1 JOHDANTO

Altistuminen tapahtuu monille kemikaaleille *ihon kautta.* Suurimmassa osassa laboratorioelämillä tehtävistä toksikologista kokeista käytetään kuitenkin suun kautta annostelua. Tässä testiohjeessa esitelty *in vivo* -ihoabsorptiotesti mahdollistaa ekstrapoloinnin suuannostelua käyttävien kokeiden tulosaineiston perusteella, kun arvioidaan kemikaalien turvallisuutta ihoaltistuksen jälkeen.

Aineen on läpäistävä runsaasti ihon solukerroksia ennen kuin se päätyy verenkiertoon. Nopeuden kannalta ratkaiseva kerros on useimpien aineiden osalta marraskesi, joka koostuu kuolleista soluista. Aineen pääsy ihon läpi riippuu sen rasvaliukoisuudesta ja orvaskeden ulomman kerroksen paksuudesta sekä myös esimerkiksi molekyylipainosta ja aineen pitoisuudesta. Rottien ja kanien iho on yleensä läpäisevämpi kuin ihmisten, kun taas marsujen ja apinoiden ihon läpäisevyys vastaa enemmän ihmisen ihon läpäisevyyttä.

Menetelmät, joilla mitataan ihon kautta imeytymistä, voidaan jakaa kahteen luokkaan: *in vivo* -menetelmiin ja *in vitro* -menetelmiin. *In vivo* -menetelmällä voidaan saada luotettavaa tietoa useilla koe-eläinlajeilla. Sittemmin on kehitetty *in vitro* -menetelmiä. Niissä tutkitaan testiaineen kulkeutumista ihmisestä tai eläimestä otetun ohennetun ihonäytteen tai kokoihonäytteen läpi nesteisiin. *In vitro* -menetelmä kuvataan erillisessä testiohjeessa (1). OECD:n asiakirjasta ”Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies” (2) on apua valittaessa sopivinta menetelmää kulloiseenkin erityistilanteeseen. Teos tarjoaa lisätietoa sekä *in vivo* -menetelmien että *in vitro* -menetelmien soveltuvuudesta.

Tässä testiohjeessa kuvatulla *in vivo* -menetelmällä määritetään testiaineen penetraatio ihon läpi verenkiertoon. Menetelmä on ollut laajassa käytössä useiden vuosien ajan (3) (4) (5) (6) (7). Vaikka *in vitro* -ihoabsorptiotestit voivat monissa tapauksissa olla sopivia, on tilanteita, joissa vain *in vivo* -kokeella saadaan tarvittavat tiedot.

In vivo -menetelmän etuna on, että siinä käytetään fysiologisesti ja metabolisesti ehyttä järjestelmää sekä useille myrkyllisyystesteille yhteistä lajia. Lisäksi *in vivo* -menetelmää voidaan mukauttaa siten, että siinä voidaan käyttää myös muita lajeja. Haittana on, että siinä käytetään eläviä eläimiä ja radioaktiivia merkkiaineita, jotta taattaisiin tulosten luotettavuus. *In vivo* -testissä on myös vaikea määrittää varhainen imeytymisvaihe. Lisäksi testiä varten suositeltavan koeeläimen (rotan) ja ihmisen ihon läpäisevyysominaisuudet poikkeavat toisistaan. Eläimen iho on yleensä läpäisevämpi, minkä vuoksi eläimillä tehdyissä kokeissa voidaan yliarvioida ihmisen ihoabsorptio (6) (8) (9). Syövyttäviä emäksiä tai muita syövyttäviä aineita ei pitäisi testata elävillä elämillä.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT

Imeytymätön annos: se testiaineen määrä, joka pestään iholta altistuksen jälkeen ja joka on jäänyt ei-okklusiivisen suojan pinnalle, mukaan lukien se testiaineen määrä, jonka voidaan osoittaa haihtuneen iholta altistuksen aikana

Imeytynyt annos *(in vivo)* se testiaineen määrä, joka on virtsassa, koe-eläinhäkin pesuvedessä, ulosteessa, uloshengitysilmassa (jos mitattu), veressä, kudoksissa (jos kerätty) sekä eläimen ruumiissa sen jälkeen, kun aplikointialueen iho on poistettu.

Mahdollisesti imeytyvä annos: se testiaineen määrä, joka on iholla tai ihossa sen jälkeen, kun iho on pesty.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiaine, joka suositellaan leimattavaksi radioaktiivisella merkkiaineella, aplikoidaan eläinten iholle, jolta on leikattu karvat. Testiaine annostellaan yleisesti käytössä olevan valmisteen muodossa, ja annostelussa käytetään yhtä tai useampaa sopivaa annostasoa. Testiaineen annetaan olla kosketuksissa ihon kanssa tietyn ajan sopivan suojan alla (ei-okklusiivinen, puoliokklusiivinen tai okklusiivinen), jotta eläin ei voi niellä testiainetta. Altistusajan lopussa suoja poistetaan ja iho puhdistetaan sopivalla puhdistusaineella. Suoja ja puhdistuksessa käytetyt materiaalit kerätään talteen analyysiä varten, ja ihon päälle pannaan uusi suoja. Eläimet ovat ennen altistusta, altistuksen aikana ja altistuksen jälkeen kukin erillisessä aineenvaihduntahäkissä, jossa eritteet ja uloshengitysilma kerätään koko ajalta talteen analyysiä varten. Uloshengitysilman kerääminen ei ole välttämätöntä, jos on riittävää näyttöä siitä, että haihtuvia radioaktiivisia metaboliitteja muodostuu vain vähän tai ei lainkaan. Kussakin tutkimuksessa käytetään normaalisti useita eläinryhmiä, jotka altistetaan testiaineelle. Yksi ryhmä lopetetaan altistusajan lopussa. Muut ryhmät lopetetaan määräaikavälein sen jälkeen (2). Näytteenottoajan lopussa lopetetaan jäljellä olevat eläimet, veri kerätään talteen analyysiä varten, altistusalueen iho poistetaan analyysiä varten ja tutkitaan, onko eläimen kehossa erittymätöntä materiaalia. Näytteistä tehdään määritykset sopivin menetelmin ja ihoabsorption aste arvioidaan (6) (8) (9).

1.4 MENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Koe-eläinten valinta**

Yleisimmin käytetty laji on rotta, mutta voidaan käyttää myös muita karvattomia kantoja ja lajeja, joiden ihoabsorption nopeus vastaa enemmän ihmisen ihon abosorptionopeutta (3) (6) (7) (8) (9). Testissä pitäisi käyttää nuoria täysikasvuisia elämiä, jotka ovat samaa sukupuolta (oletusarvoisesti uroksia) ja peräisin yleisesti käytetyistä laboratoriokannoista. Testin alussa koe-eläinten paino saa vaihdella enintään ± 20 % keskipainosta. Esimerkiksi 200–250 g painavat urosrotat ovat sopivia (erityisesti painoasteikon yläosassa).

▼B

1.4.2 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Kunkin testiaineen ja kunkin lopetusajankohdan osalta on käytettävä vähintään neljä samaa sukupuolta edustavan eläimen ryhmää. Kukin eläinryhmä lopetetaan eri ajankohtina, esimerkiksi altistusajan lopussa (tyypillisesti 6 tai 24 tuntia) ja sen jälkeen määräajankohtina (esim. 48 ja 72 tunnin kuluttua). Jos on näyttöä merkittävistä eroista uros- ja naarasyksilöiden ihomyrkyllisyydessä, on valittava herkempi sukupuoli. Jos tällaista näyttöä ei ole, voidaan valita kumpi tahansa sukupuoli.

1.4.3 **Häkit ja ruokinta**

Koe-eläinhuoneen lämpötilan on oltava 22 °C (± 3 °C). Suhteellisen kosteuden on oltava vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen siivouksen aikana. Suhteellinen kosteus pitäisi kuitenkin pyrkiä pitämään välillä 50–60 %. Valolähteenä on keinovalo, jaksoittaisuus 12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeyttä. Ravintona voidaan käyttää tavanomaista laboratoriorehua, jota pitäisi olla jatkuvasti eläinten saatavilla samoin kuin juomavettä. Testin ja mielellään myös laboratorio-olosuhteisiin totutuksen aikana eläimet ovat aineenvaihduntahäkeissä (yksi kussakin). Koska ruoan ja veden läikkyminen vaikuttaisi tuloksiin, sen todennäköisyys on minimoitava.

1.4.4 **Eläinten preparointi**

Eläimet merkitään, jotta ne voidaan tunnistaa yksilökohtaisesti, ja pidetään häkeissä vähintään viisi päivää ennen testin alkua, jotta ne voidaan totuttaa laboratorio-olosuhteisiin.

Totutusajan lopussa ja noin 24 tuntia ennen testiaineen annostelua kultakin eläimeltä leikataan karvat osalta hartioiden ja selän alueen ihoa. Vahingoittuneen ihon läpäisevyysominaisuudet poikkeavat ehyen ihon läpäisevyysominaisuuksista, minkä vuoksi on vältettävä ihon raapiintuminen tai hiertyminen. Karvojen leikkaamisen jälkeen ja noin 24 tuntia ennen testiaineen aplikointia (ks. kohta 1.4.7) ihonäytteen pinta pyyhitään asetonilla talin poistamiseksi. Muuta pesua saippualla ja vedellä ei suositella, koska saippuajäämät voivat edistää testiaineen imeytymistä. Pinta-alan on oltava tarpeeksi suuri (mielellään aikakin 10 cm^2), jotta voidaan luotettavasti määrittää testikemikaalin imeytynyt määrä ihoneliösenttimetriä kohti. Kymmenen neliösentimetrin näyte saadaan rotista, joiden paino on 200–250 g. Preparoinnin jälkeen eläimet pannaan takaisin aineenvaihduntahäkkeihin.

1.4.5 **Testiaine**

Testiaine on aine, jonka penetraatio-ominaisuuksia testissä tutkitaan. Testiaine suositellaan leimattavaksi radioaktiivisella merkkiaineella.

1.4.6 **Testin valmistelu**

Testiainevalmisteen (esim. testiaineen sisältävä laimentamaton tai laimennettu materiaali tai formulaatio, joka aplikoidaan iholle) on oltava sama kuin valmiste, jolle ihmiset tai muut kohdelajit voivat altistua, tai kyseisen valmisteen realistinen korvike. Käytössä olevasta valmisteesta poikkeaminen on perusteltava. Tarvittaessa testiaine on liuotettava tai suspendoitava sopivaan kantaja-aineeseen. Jos kantaja-aineena käytetään muuta kuin vettä, sen imeytymisominaisuudet ja mahdollinen reagointi testiaineen kanssa on tunnettava.

▼B

1.4.7 **Aplikointi iholle**

Ihon pinnalle määritetään aplikointialue (tietty pinta-ala). Tunnettu määrä testiainetta aplikoidaan tasaisesti tälle alueelle. Määrän olisi jäljiteltävä altistumista ihmisissä, minkä vuoksi se on tyypillisesti 1–5 mg/cm^2, kun testiaine on kiinteä, ja enintään 10 µl/cm^2, kun testiaine on nestemäinen. Jos käytetään muuta määrää, tämä pitäisi perustella ennakoiduilla käyttöolosuhteilla, tutkimuksen tavoitteilla ja testiaineen fysikaalisilla ominaisuuksilla. Aplikoinnin jälkeen on estettävä se, että eläin puhdistaa alueen. Kuvassa 1 on esimerkki tyypillisestä laitteesta. Tavallisesti aplikointialue peitetään ei-okklusiivisella suojalla (esim. läpäisevällä nailonharsolla). Jos on kyse rajoittamattomasta annoksesta, aplikointialue on peitettävä okklusiivisella suojalla. Jos puolihaihtuvien testiaineiden haihtuminen vähentää testiaineen saantonopeutta liikaa (ks. myös kohta 1.4.10, ensimmäinen alakohta), haihtunut aine on kerättävä laitteen peittävään hiilisuodattimeen (ks. kuva 1). On tärkeää huolehtia siitä, että mikään väline ei vahingoita ihoa eikä absorboi testiainetta tai reagoi sen kanssa. Eläimet palautetaan aineenvaihduntahäkkeihin eritteiden keräämiseksi.

1.4.8 **Altistus- ja näytteenottoaika**

Altistusaika on aika, joka kuluu testiaineen aplikoinnista sen poistamiseen (ihon pesemiseen). Altistusaika (tyypillisesti 6 tai 24 tuntia) valitaan sen mukaan, mikä on ennakoitu altistusaika ihmisissä. Altistusajan jälkeen eläimiä pidetään aineenvaihduntahäkeissä niiden lopettamisajankohtaan asti. Koko testin ajan on tarkistettava määrävälein, onko eläimissä merkkejä toksisuudesta tai esiintyykö epänormaaleja reaktioita. Altistusajan lopussa on tarkistettava, onko käsitellyssä ihossa näkyviä merkkejä ärsytyksestä.

Aineenvaihduntahäkkien on oltava sellaisia, että virtsa ja ulosteet voidaan kerätä kumpikin erikseen koko testin ajan. Lisäksi ^{14}C-hiilidioksidi ja haihtuvat ^{14}C-hiiliyhdisteet on voitava kerätä. Nämä on analysoitava, jos niiden määrä on > 5 %. Virtsa, ulosteet ja haihtuvien aineiden keräämiseen tarkoitettu neste (esim. ^{14}C-hiilidioksidi ja haihtuvat ^{14}C-yhdisteet) on kerättävä kukin erikseen kustakin ryhmästä kunakin näytteenottoajankohtana. Jos on riittävää näyttöä, että haihtuvia radioaktiivisia metaboliitteja muodostuu vain vähän tai ei lainkaan, voidaan käyttää avoimia häkkejä.

Eritteet kerätään altistuaikana 24 tunnin ajalta ensimmäisen ihokontaktin jälkeen ja tämän jälkeen päivittäin testin loppuun asti. Yleensä riittää, että eritteet kerätään kolme kertaa, mutta testiaineen ennakoidun käyttötarkoituksen tai käytettävissä olevien kineettisten tietojen perusteella ajankohtia voidaan lisätä tai niitä voidaan muuttaa.

Altistusajan lopussa suoja poistetaan kustakin eläimestä ja pannaan talteen erillistä analyysiä varten. Kaikkien eläinten käsitelty iho pestään vähintään kolme kertaa puhdistusaineella käyttäen sopivia tuppoja. Muiden ruumiinosien kontaminoituminen on huolellisesti vältettävä. Puhdistusaineen pitäisi olla normaalien hygieniakäytäntöjen mukainen (esim. vesi-saippualiuos). Lopuksi iho kuivataan. Kaikki tupot ja pesuvedet pannaan talteen analyysiä varten. Ennen eläinten siirtämistä häkkeihin asetetaan paikalleen uusi suoja suojaamaan käsiteltyä aluetta niissä eläimissä, joiden ryhmät lopetetaan vasta myöhemmin.

▼B

1.4.9 **Lopetus**

Kunkin ryhmän eläimet lopetetaan määräajankohtana ja veri kerätään talteen analyysiä varten. Suoja tai peite poistetaan analyysiä varten. Aplikointialueen iho ja vastaava alue ihoa, jolta on leikattu karvat mutta jota ei ole altistettu testiaineelle, poistetaan kustakin eläimestä erillistä analyysiä varten. Aplikointialueen iho voidaan jaottaa erottamalla marraskesi sen alla olevasta orvaskedestä, jotta saataisiin tarkemmat tiedot testikemikaalin jakautumisesta. Tämän jakautumisen määrittäminen tietyltä ajalta altistusajan jälkeen tarjoaa tietoa siitä, miten testikemikaali läpäisee marraskeden. Ihon jaotuksen helpottamiseksi (ihon viimeisen pesun ja eläimen lopettamisen jälkeen) kukin suoja poistetaan. Aplikointialue (ja rengasmainen alue ympäröivää ihoa) leikataan rotasta ja kiinnitetään levylle. Pala teippiä painetaan varovasti ihon pinnalle ja irrotetaan sitten niin että osa marraskettä tulee mukaan. Menettely toistetaan uusilla teipinpaloilla, kunnes teippi ei enää kiinnity ihon pintaan (kun koko marraskesi on poistettu). Kunkin eläimen kaikki teipinpalat pannaan samaan astiaan, johon lisätään liuotinta, joka pystyy liuottamaan marraskeden täydellisesti. Mahdolliset kohdekudokset voidaan poistaa erillistä analyysiä varten ennen kuin jäljellä olevan eläimen ruumis analysoidaan (ruumiiseen imeytynyt annos). Yksittäiset eläinten ruumiit pannaan talteen analyysiä varten. Yleensä riittää kokonaissisällön analyysi. Kohde-elimet voidaan kuitenkin ottaa erilleen erillistä analyysiä varten (jos muut tutkimukset antavat tähän aihetta). Virtsarakossa eläinten lopettamishetkellä oleva virtsa lisätään aikaisemmin kerättyyn virtsamäärään. Kun aineenvaihduntahäkeistä on kerätty eritteet eläinten lopettamisen yhteydessä, häkit ja niiden keräyslaitteet pestään sopivalla liuottimella. Myös muut mahdollisesti kontaminoituneet välineet on analysoitava.

1.4.10 **Analyysi**

Kaikissa kokeissa on päästävä riittävään saantoon (keskiarvon on oltava 100 ± 10 % radioaktiivisuudesta). Poikkeamat tästä on perusteltava. Kussakin näytteessä oleva määrä analysoidaan asianmukaisesti validoiduilla menetelmillä.

Kunkin aplikoinnin osalta on määritettävä rinnakkaisnäytteiden hajonta.

2. **TULOKSET**

Kunkin eläimen osalta on tehtävä testikemikaalista ja/tai metaboliiteista kunakin näytteenottoajankohtana seuraavat mittaukset. Yksittäisten tulosten lisäksi on ilmoitettava kootut tulokset näytteenottoajankohdittain keskiarvoina.

— suojan pinnalle jäänyt määrä,

— määrä, joka voidaan irrottaa iholta,

— ihossa tai iholla oleva määrä, jota ei voida pestä siitä,

▼B

— näytteenä otetussa veressä oleva määrä,

— eritteissä ja uloshengitysilmassa oleva määrä (jos määritetty),

— kuolleen eläimen ruumiissa ja erillistä analyysiä varten poistetuissa elimissä oleva määrä.

Eritteissä, uloshengitysilmassa, veressä ja kuolleen eläimen kehossa olevan testiaineen ja/tai metaboliittien määrän perusteella voidaan määrittää kunakin ajankohtana imeytynyt kokonaismäärä. Lisäksi voidaan laskea altistusaikana imeytynyt testikemikaalin määrä ihoneliösenttimetriä kohti.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on esitettävä, miten testiohjeessa asetetut vaatimukset on täytetty (mm. käytetyn testijärjestelmän perustelut). Siinä on oltava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— tunnistetiedot (esim. CAS-numero, jos se tiedetään; toimituslähde; puhtaus (radiokemiallinen puhtaus); tunnetut epäpuhtaudet; erän numero),

— fysikaalinen muoto ja fysikokemialliset ominaisuudet (esim. pH, haihtuvuus, liukoisuus, stabiilius, molekyylipaino ja log P_{ow}).

Testiainevalmiste:

— formulaatio ja käytön perustelut,

— valmiste, aplikoitu annos, aineen pitoisuus valmisteessa, kantajaaine, stabiilius ja homogeenisyys.

Koe-eläin:

— käytetty laji/kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— eläinten hankintapaikka, häkit, rehut jne.,

— yksittäisten eläinten paino testin alussa.

Koeolosuhteet:

— testiaineen annostelu (aplikointialue, määritysmenetelmät, okkluusio vai ei, volyymi, uutto, osoitusmenetelmä),

— ravinnon ja veden laatu.

Tulokset:

— mahdolliset merkit toksisuudesta,

— absorptiotulokset taulukkomuodossa (imeytymisnopeutena sekä määränä tai prosenttiosuutena).

▼B

— testin kokonaissaannot,

— tulosten tulkinta, vertailu mahdollisiin käytettävissä oleviin tietoihin, jotka koskevat testiyhdisteen imeytymistä ihon läpi.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829–835.

5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

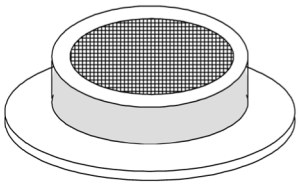
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369–373.

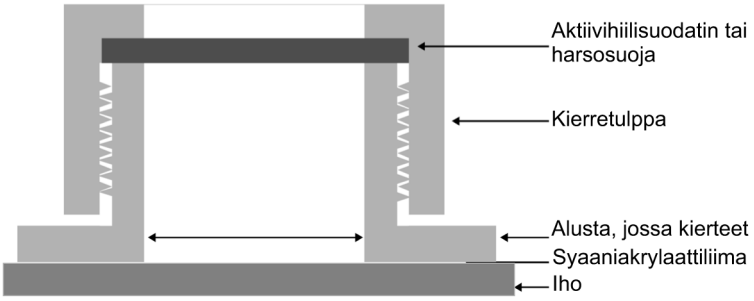
9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. J. *Invest Dermatol.* 54, 399–404.

▼B

Kuva 1

Esimerkki tyypillisestä laitteesta, jota käytetään suojaamaan aplikointialue *in vivo* -ihoabsorptiotestissä





▼B

B.45. **IHON KAUTTA IMEYTYMINEN: *IN VITRO* -MENETELMÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro TG 428 (2004)

1.1. JOHDANTO

Tämän testimenetelmän tarkoituksena on tarjota tietoa poisleikatulle ihonäytteelle aplikoidun testiaineen imeytymisestä. Se voidaan suorittaa yhdessä testimenetelmän ”Ihon kautta imeytyminen: *In vivo* -menetelmä” (1) kanssa tai erikseen. Tähän testimenetelmään perustuvien kokeiden suunnittelussa suositellaan käytettäväksi apuna OECD:n asiakirjaa ”Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies” (2). OECD:n asiakirjasta on apua valittaessa sopivaa *in vitro*-menetelmää erityisolosuhteisiin, jotta voidaan varmistaa testimenetelmällä saatavien tulosten luotettavuus.

Menetelmät, joilla määritetään aineen imeytymistä ja vapautumista elimistöön ihon kautta, voidaan jakaa kahteen luokkaan: *in vivo* -menetelmiin ja *in vitro* -menetelmiin. Ihoabsorption *in vivo* -määritysmenetelmät ovat vakiintuneita ja tarjoavat farmakokineettistä tietoa useiden eri eläinlajien osalta. *In vivo* -menetelmä kuvataan erillisessä testiohjeessa (1). Myös *in vitro* -menetelmiä on käytetty useiden vuosien ajan ihoabsorption määrittämiseen. Vaikka tämän testiohjeen kattamista *in vitro* -menetelmistä ei ole tehty virallisia validointitutkimuksia, OECD:n asiantuntijat katsoivat vuonna 1999, että *in vitro* -menetelmän tueksi oli riittävä määrä eveluoituja tutkimustuloksia (3). OECD:n asiakirjassa annetaan tämän tueksi lisätietoja (mm. runsaasti *in vitro* -menetelmien ja *in vivo* -menetelmien suoraa vertailutietoa) (2). Aiheesta on tehty useita erityisteoksia, jotka tarjoavat yksityiskohtaista taustatietoja *in vitro* -menetelmän käytön tueksi (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). *In vitro* -menetelmillä mitataan kemikaalien diffundoitumista ihoon ja ihon läpi nesteisiin. Niissä voidaan käyttää ei-elävää ihoa, kun määritetään vain diffundoituminen, tai tuoretta aineenvaihdunnallisesti aktiivia ihoa, jos määritetään samalla sekä diffundoituminen että ihon aineenvaihdunta. Näille menetelmille on erityistä käyttöä luokiteltaessa erityyppisiä kemikaaleja sen mukaan, miten ne voidaan vapauttaa erilaisista formulaatioista ihoon tai ihon läpi. Ne ovat myös hyödyllisiä malleja arvioitaessa ihon läpi imeytymistä ihmisissä.

In vitro -menetelmää ei voida soveltaa kaikissa tilanteissa eikä kaikkiin kemikaaleihin. *In vitro* -testimenetelmää voi olla mahdollista soveltaa ihopenetraation alustavaan laadulliseen arviointiin. Joissain tapauksissa tämä voi vaatia tuekseen *in vivo* -testejä. OECD:n asiakirja (2) antaa lisätietoja tilanteista, joihin *in vitro* -menetelmä soveltuu. Muuta lisätietoa päätöksen tueksi: kirjallisuusviite (3).

Tässä testiohjeessa esitetään yleiset periaatteet testiaineen ihoabsorption määrittämiseksi käyttämällä ihopalaa näytteenä. Siinä voidaan käyttää useiden nisäkäslajien (myös ihmisen) ihoa. Ihon läpäisevyysominaisuudet säilyvät sen jälkeen, kun iho on leikattu kehosta, koska diffundoitumisen pääasiallinen este on ihon kuollut pintakerros eli marraskesi; kemikaalien aktiivista kuljetusta ihon läpi ei ole voitu todeta. Ihon on todettu kykenevän metabolisoimaan joitakin kemikaaleja imeytymisen aikana (6), mutta tämä ei rajoita varsinaisen annoksen imeytymisnopeutta. Se voi kuitenkin vaikuttaa verenkiertoon pääsevän aineen luonteeseen.

▼B

1.2. MÄÄRITELMÄT

Imeytymätön annos: se testiaineen määrä, joka pestään iholta altistuksen jälkeen ja joka on jäänyt ei-okklusiivisen suojan pinnalle, mukaan lukien se testiaineen määrä, jonka voidaan osoittaa haihtuneen iholta altistuksen aikana

Imeytynyt annos *(in vitro):* se testiaineen määrä, joka päätyy vastaanottonesteeseen tai verenkiertoon tietyn ajan kuluessa

Mahdollisesti imeytyvä annos *(in vitro):* se testiaineen määrä, joka on iholla tai ihossa sen jälkeen, kun iho on pesty.

1.3. TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiaine, joka voi olla radioaktiivisella merkkiaineella leimattu, aplikoidaan diffuusiokammion eri osastojen väliin asetetun ihonäytteen pinnalle. Kemikaalia pidetään iholla tietyn ajan tietyissä olosuhteissa, minkä jälkeen se poistetaan sopivalla puhdistusmenetelmällä. Vastaanottonesteestä otetaan koko testin ajan määräajankohdin näytteet sen tarkistamiseksi, onko vastaanottonesteessä testikemikaalia ja/tai sen metaboliitteja.

Käytettäessä aineenvaihdunnallisesti aktiiveja järjestelmiä testikemikaalin metaboliitit voidaan analysoida sopivin menetelmin. Testin lopussa testikemikaalin ja (tapauksesta riippuen) sen metaboliittien jakautuminen kvantifioidaan.

Testiaineen imeytyminen tietyn ajan kuluessa määritetään analysoimalla vastaanottoneste ja käsitelty iho. Vaadittavat olosuhteet kuvataan tässä testiohjeessa ja OECD:n asiakirjassa (2). Ihossa edelleen oleva testiaine on katsottava imeytyneeksi, ellei voida osoittaa, että imeytyminen voidaan määrittää vain vastaanottonestettä analysoimalla. Analysoimalla muut testijärjestelmän komponentit (iholta pesty materiaali ja ihokerroksissa edelleen oleva materiaali) voidaan saada lisätietoja, joiden perusteella voidaan määrittää muun muassa testiaineen eri komponentteihin jakautuminen ja saantoprosentti (kokonaismäärät).

Jotta voidaan osoittaa testijärjestelmän suorituskyky ja luotettavuus laboratoriossa, käytettävissä on oltava sopivilla vertailukemikaaleilla hankitut tulokset, joiden on oltava sopusoinnussa käytettyä menetelmää koskevan julkaistun kirjallisuuden kanssa. Tämä vaatimus voidaan täyttää testaamalla sopiva vertailuaine (mielellään testiainetta muistuttava rasvaliukoinen aine) samanaikaisesti testiaineen kanssa tai tarjoamalla riittävät aiemmat tiedot useista vertailuaineista, joiden rasvaliukoisuus poikkeaa toisistaan (esim. kafeiini, bentsoehappo ja testosteroni).

1.4. TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Diffuusiokammio**

Diffuusiokammio muodostuu lähettäjä- ja vastaanotto-osastosta, joiden väliin ihonäyte asetetaan (tyypillinen diffuusiokammio esitetään kuvassa 1). Ihopalan reunat on kiinnitettävä tiiviisti kammioon, ja kammion pitäisi mahdollistaa helppo näytteidenotto. Ihonäytteen alapinnan kanssa kosketuksissa olevan vastaanottoliuoksen pitäisi voida sekoittua hyvin. Diffuusiokammion ja sen sisällön lämpötilan on oltava säädettävissä. Sekä staattista että läpivirtausjärjestelmää käyttäviä diffuusiokammioita voidaan käyttää. Tavallisesti lähettäjäosastossa ei käytetä okkluusiota, kun ihonäytettä altistetaan rajalliselle määrälle testiainetta. Lähettäjäosastossa voidaan kuitenkin käyttää okkluusiota, jos altistusannosta ei ole rajoitettu, sekä myös tietyissä rajallisilla annoksilla tehtävissä kokeissa.

▼B

1.4.2. **Vastaanottoneste**

Fysiologisesti yhteensopivan vastaanottoliuoksen käyttö on suositeltavaa, mutta myös muunlaisia vastaanottoliuksia voidaan käyttää, kunhan tämä perustellaan. Vastaanottonesteen tarkka koostumus on ilmoitettava. On osoitettava, että testikemikaalilla on riittävä liukenevuus vastaanottonesteessä, jotta tämä ei toimi esteenä imeytymiselle. Lisäksi vastaanottoneste ei saa vaikuttaa ihonäytteen funktionaaliseen eheyteen. Läpivirtausjärjestelmässä virtausnopeus ei saa haitata testiaineen diffundoitumista vastaanottonesteeseen. Staattisessa kammiojärjestelmässä nestettä on jatkuvasti sekoitettava ja siitä on otettava näytteitä säännöllisesti. Jos tutkitaan metaboliaa, ihonäytteen on pysyttävä elävänä koko testin ajan.

1.4.3 **Ihonäytteet**

Testissä käytetään ihmisestä tai eläimestä otettua ihoa. Ihmisihon käyttöön on sovellettava kansallisia ja kansainvälisiä eettisiä käytäntöjä ja ehtoja. On suositeltavaa käyttää elävää ihoa, mutta myös kuollutta ihoa voidaan käyttää, kunhan osoitetaan ihon funktionaalinen eheys. Hyväksyttäviä ovat joko (entsyymi, lämpö- tai kemiallisilla menetelmillä erotetut) orvaskesikalvot tai ihohöylällä (dermatomilla) irrotetut ohennetut ihonäytteet (split thickness skin) (paksuus tyypillisesti 200–400 μm). Myös kokoihonäytteitä (full thickness skin) voidaan käyttää, mutta liiallista ihonäytteen paksuutta (n. > 1 mm) pitäisi välttää, ellei sitä erityisesti edellytetä testikemikaalin määrittämiseksi ihokerroksissa. Laji, anatominen näytteenottopaikka ja käytetty menetelmä on perusteltava. Hyväksyttävät testitulokset tarvitaan vähintään neljästä rinnakkaisesta näytteestä testiä kohti.

1.4.4 **Ihonäytteen eheys**

On tärkeää, että ihonäyte valmistetaan oikein. Epäasianmukainen käsittely voi vahingoittaa marraskettä, minkä vuoksi ihonäytteen eheys on varmistettava. Jos tutkimuskohteena on ihon metabolia, vastaleikattu ihonäyte pitäisi käyttää testissä mahdollisimman pian ja olosuhteissa, joiden tiedetään tukevan metabolista toimintaa. Yleissääntönä on, että vastaleikattu iho käytetään 24 tunnin kuluessa, mutta hyväksyttävä varastointiaika voi vaihdella riippuen aineenvaihduntaan osallistuvasta entsyymijärjestelmästä ja varastointilämpötilasta (13). Jos ihonäytteet on varastoitu ennen käyttöä, on osoitettava, että ihon läpäisyä estävät ominaisuudet ovat testiajankohtana ennallaan.

1.4.5 **Testiaine**

Testiaine on aine, jonka penetraatio-ominaisuuksia testissä tutkitaan. Testiaine suositellaan leimattavaksi radioaktiivisella merkkiaineella.

1.4.6 **Testin valmistelu**

Testiainevalmisteen (esim. testiaineen sisältävä laimentamaton tai laimennettu materiaali tai formulaatio, joka aplikoidaan iholle) olisi mielellään oltava sama kuin valmiste, jolle ihmiset tai muut kohdelajit voivat altistua, tai kyseisen valmisteen realistinen korvike. Käytössä olevasta valmisteesta poikkeaminen on perusteltava.

▼B

1.4.7 **Testiaineen pitoisuudet ja formulaatiot**

Normaalisti käytetään useampaa kuin yhtä testiaineen pitoisuutta siten, että pitoisuudet kattavat potentiaalisen altistuksen yläpään arvot (ihmisissä). Samoin on harkittava useiden tyypillisten formulaatioiden testaamista.

1.4.8 **Aplikointi iholle**

Ihmisen altistuessa kemikaaleille annokset ovat normaalioloissa rajallisia. Siksi altistumista jäljittelevässä annostelussa testiainetta aplikoidaan iholle tavallisesti 1-5 mg/cm^2, kun testiaine on kiinteä, ja enintään 10 µl/cm^2, kun testiaine on nestemäinen. Aplikoitavan määrän perusteluina ovat ennakoidut käyttöolosuhteet, tutkimuksen tavoitteet ja testivalmisteen fysikaaliset ominaisuudet. Esimerkiksi testiaineen aplikointi voi olla rajoittamatonta tapauksissa, joissa valmistetta aplikoidaan suuria määriä pinta-alayksikköä kohti.

1.4.9 **Lämpötila**

Lämpötila vaikuttaa kemikaalien passiiviseen diffuusioon (ja näin ollen niiden imeytymiseen ihon läpi). Diffuusiokammion ja ihonäytteen lämpötila on pidettävä vakiona lähellä ihon normaalilämpötilaa 32 ± 1 ºC. Erilaiset diffuusiokammiot edellyttävät erilaisia vesihauteen ja blokkikuumentimen lämpötiloja, jotta varmistetaan, että vastaanottofaasi tai ihonäyte on fysiologisessa vakiotilassaan. Suhteellisen kosteuden arvoksi suositellaan 30–70 %.

1.4.10 **Altistusaika ja näytteenotto**

Ihoa voidaan altistaa testiaineelle koko testin ajan tai lyhyempiä aikoja (esim. jonkin tietyntyyppisen altistuksen jäljittelemiseksi). Iholta pestään ylimääräinen testiaine sopivalla puhdistusaineella, ja huuhteluvesi kerätään talteen analyysiä varten. Menetelmä, jolla testiaine poistetaan, riippuu ennakoiduista käyttöolosuhteista, ja se on perusteltava. Näytteenottoaika on tavallisesti 24 tuntia, jotta absorptioprofiili voitaisiin karakterisoida riittävästi. Koska ihon eheys voi alkaa heikentyä 24 tunnin kuluttua, näytteenottoaika ei tavallisesti saisi ylittää 24 tuntia. Jotkin aineet edellyttävät pitempää näytteenottoaikaa (24 tuntia), mutta nopeasti imeytyville se ei ehkä ole tarpeen. Vastaanottonesteestä on otettava näytteitä tarpeeksi tiheästi, jotta testiaineen absorptioprofiili voidaan esittää graafisesti.

1.4.11 **Loppumenettelyt**

Kaikki testijärjestelmän komponentit on analysoitava ja saanto määritettävä. Komponetteihin kuuluvat lähettäjäosasto, ihonäytteen pinnan huuhteluvesi, ihonäyte ja vastaanottoneste/osasto. Joissain tapauksissa iho voidaan erillistä analyysiä varten jaottaa ihon altistuneeseen osaan, kammion reunan alla olevaan osaan, marrasketeen, orvasketeen ja verinahkaan.

1.4.11 **Analyysi**

Kaikissa kokeissa on saavutettava riittävä saanto (keskiarvon on oltava 100 ± 10 % radioaktiivisuudesta; poikkeaminen tästä on perusteltava). Vastaanottonesteessä, ihonäytteessä sekä ihon pinnan ja laitteiden huuhteluvedessä oleva testiaine on analysoita sopivalla menetelmällä.

▼B

2. **TULOKSET**

Tuloksina esitetään vastaanottonesteen analyysi, testiaineen jakauma testijärjestelmässä ja absorptioprofiili ajan funktiona. Kun aplikoitu annos on rajallinen, iholta pesty määrä, ihossa (ihon eri kerroksissa, jos analysoitu erikseen) ja vastaanottonesteessä oleva määrä (imeytymisnopeus sekä määrä tai prosenttiosuus aplikoidusta annoksesta) on määritettävä. Ihon läpi imeytyminen voidaan joskus ilmaista käyttämällä pelkästään vastaanottonesteen analyysistä saatuja tuloksia. Jos testiainetta on kuitenkin edelleen ihossa testin lopussa, se saattaa olla tarpeen sisällyttää imeytyneeseen kokonaismäärään (ks. kirjallisuusviite [3], kohta 66). Jos on käytetty rajoittamatonta annosta, testitulosten perusteella voi olla mahdollista määrittää läpäisyvakio (K_p). Viimeksi mainitussa tapauksessa imeytymisprosentti ei ole merkityksellinen.

3. **RAPORTOINTI**

3.1. TESTISELOSTE

Testiselosteessa on esitettävä, miten testiohjeessa asetetut vaatimukset on täytetty (mm. käytetyn testijärjestelmän perustelut). Siinä on oltava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet (ainakin molekyylipaino ja log P_{ow}), puhtaus (radiokemiallinen puhtaus)

— tunnistetiedot (esim. erän numero)

— liukoisuus vastaanottonesteeseen.

Testiainevalmiste:

— formulaatio ja käytön perustelut

— homogeenisyys.

Koeolosuhteet:

— ihonäytteen lähde ja anatominen näytteenottopaikka, käytetty valmistusmenetelmä, varastointiolosuhteet ennen käyttöä, mahdollinen esikäsittely (puhdistus, antibioottikäsittely jne.), ihon funktionaalisen eheyden määritys, metabolinen tila, käytön perustelut

— diffuusiokammion tyyppi, vastaanottonesteen koostumus, vastaanottonesteen virtausnopeus tai näytteenottoajat ja -menettelyt

— testiaineen aplikointimenetelmä ja aplikoidun annoksen määrän määrittäminen

— altistusaika

— miten testiaine poistetaan iholta (esim. ihon huuhtelu)

— ihonäytteen analyysimenetelmä ja mahdolliset jaotustekniikat, joita käytettiin jakautumisen määrittämiseksi ihossa

▼B

— diffuusiokammion ja muiden laitteiden pesumenetelmät

— määritysmenetelmät, uuttomenetelmät, detektiorajat ja analyysimenetelmän validointi.

Tulokset:

— kokonaissaanto (aplikoitu annos = ihon huuhteluvesi + ihonäyte + vastaanottoneste + diffuusiokammion huuhteluvesi)

— yksittäisten diffuusiokammioiden saannot kunkin osaston osalta (taulukkomuodossa)

— absorptioprofiili

— absorptiotiedot taulukkomuodossa (imeytymisnopeutena sekä määränä tai prosenttiosuutena).

Tulosten pohdinta.

Päätelmät.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237–241.

6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191–205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et* al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

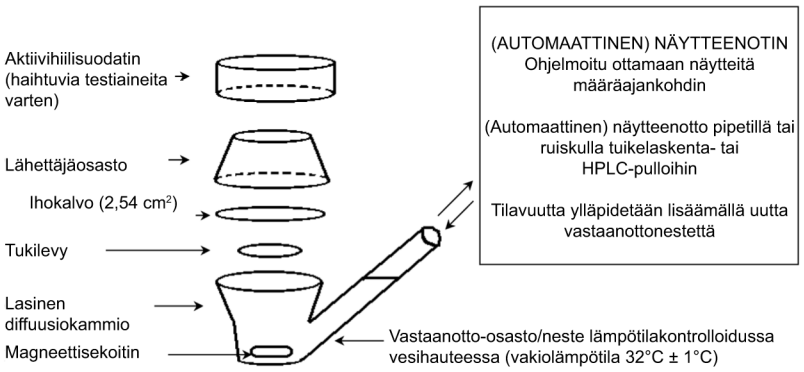
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356–365.

Kuva 1

Esimerkki tyypillisestä in vitro -ihoabsorptiotestissä käytettävästä staattisesta diffuusiokammiosta



▼M3

B.46. *IN VITRO* -IHOÄRSYTTÄVYYS: REKONSTRUOIDUN IHMISORVASKEDEN TESTIMENETELMÄ

JOHDANTO

1. Ihoärsytyksellä tarkoitetaan korjautuvan ihovaurion syntymistä enintään neljä tuntia kestäneen testiaineen annostelun jälkeen (kuten on määritelty Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmässä (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures) ja aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta 16 päivänä joulukuuta 2008 annetussa Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 (CLP-asetus) (1) (3)). Tässä testimenetelmässä selostetaan *in vitro* -menettely, jolla voidaan määrittää ärsyttävien kemikaalien (aineiden ja seosten) vaarallisuus YK:n GHS-järjestelmän ja EU:n CLP-asetuksen luokan 2 mukaisesti (1) (2) (3). EU:ssa ja muilla alueilla, joilla ei ole hyväksytty YK:n GHS-järjestelmän valinnaista luokkaa 3 (lievästi ärsyttävät aineet), tätä testimenetelmää voidaan käyttää myös luokittelemattomien kemikaalien (YK:n GHS-järjestelmän ja EU:n CLP-asetuksen ”ei luokitusta”) määrittämiseen (1) (3). Tämän testimenetelmän avulla voidaan määrittää kemikaalien ihoärsytys yksittäisenä korvaavana testinä vaiheittaisen testausstrategian *in vivo* -ihoärsytystestauksen asemesta (4 ja tämän liitteen B.4 luku).

2. Ihoärsyttävyyden arviointi on tyypillisesti edellyttänyt koe-eläinten käyttöä (OECD:n testiohje 404; tämän liitteen B.4 luku) (4). Eläinten hyvinvointiin liittyvien näkökohtien osalta menetelmää B.4 tarkistettiin vuonna 2004 niin, että ihosyövyttävyys ja ihoärsyttävyys voidaan määrittää soveltamalla vaiheittaista testausstrategiaa käyttäen *in vitro*- tai *ex vivo* -testimenetelmiä, joiden avulla vältetään eläimille aiheutuva kipu ja kärsimys. Kolme validoitua *in vitro* -testimenetelmää on hyväksytty OECD:n testiohjeina 430, 431 ja 435 (5) (6) (7) ja kaksi tämän liitteen B.40 ja B.40a lukuna, ja niitä voidaan käyttää menetelmän B.4 ja OECD:n testiohjeen 404 vaiheittaisen testausstrategian syövyttävyysosiossa (4).

3. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan ihoärsytystä ihmisten terveyteen liittyvänä määrityskohteena. Tämä testimenetelmä perustuu ihmisen rekonstruoituun orvasketeen (Reconstructed human Epidermis, RhE), joka jäljittelee läheisesti ihmisihon ylemmän kerroksen eli epidermiksen biokemiallisia ja fysiologisia ominaisuuksia (solut ovat peräisin ihmisen orvaskeden keratinosyyteistä, ja testissä käytetään edustavaa kudos- ja soluarkkitehtuuria). Tähän testimenetelmään sisältyy myös sarja suoritusvaatimuksia (lisäys 2), joilla voidaan arvioida samanlaisia ja muunnettuja rekonstruoituun ihmisorvasketeen perustuvia menetelmiä. Suoritusvaatimukset on kehittänyt EC-ECVAM (8) OECD:n ohjeasiakirjan nro 34 (9) periaatteiden mukaisesti.

4. On olemassa kolme validoitua menetelmää, joissa noudatetaan tätä testimenetelmää. Validointia edeltävää vaihetta, optimointia ja validointia koskevat tutkimukset on saatettu päätökseen sen *in vitro* -menetelmän (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) osalta, jossa käytetään rekonstruoitua ihmisorvaskesimallia ja joka on kaupallisesti saatavilla nimellä EpiSkin™ (”validoitu vertailumenetelmä”, VVM). Kahdesta muusta kaupallisesti saatavilla olevasta ihoärsytyksen *in vitro* -menetelmästä, joissa käytetään RhE-menetelmää, on saatu samankaltaisia tuloksia kuin VVM:stä suoritusvaatimuksiin perustuvan validoinnin (21) perusteella. Nämä menetelmät ovat EpiDerm™-ihoärsytystesti (EPI-200) ja SkinEthic™-RhE-menetelmät (22).

▼M3

5. Ennen kuin ehdotettua samanlaista tai mukautettua *in vitro* -RhE-menetelmää, joka ei ole VVM, EpiDerm™-ihoärsytystesti (EPI-200) tai SkinEthic™-RhE-menetelmä, voidaan käyttää lainsäädännössä määriteltyihin tarkoituksiin, sen luotettavuus, merkittävyys (tarkkuus) ja ehdotetun käytön rajoitukset on määritettävä, jotta voidaan varmistaa, että sitä voidaan verrata VVM:ään tässä testimenetelmässä (lisäys 2) vahvistetuissa suoritusvaatimuksissa asetettujen vaatimusten mukaisesti. Lisäksi suositellaan, että ennen samanlaisen tai mukautetun *in vitro* -RhE-menetelmän validointia ja toimittamista sääntelyviranomaisten hyväksyttäväksi on syytä tarkastella *in vitro* -ihoärsytystestausta koskevaa OECD:n perusteluasiakirjaa (23).

MÄÄRITELMÄT

6. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVIA POHDINTOJA JA RAJOITUKSET

7. Validointitutkimuksen (16) mukaisesti tämän testimenetelmän rajoituksena on, että kemikaalien luokittelu YK:n GHS-luokkaan 3 (lievästi ärsyttävät aineet) (1) ei ole mahdollista. Myöhemmin tehtävä *in vivo* -testaus voi olla tarpeen osittain korvaavana testinä ihoärsytyspotentiaalin ominaisuuksien täydellistä määrittämistä varten (4 ja tämän liitteen B.4 luku). On syytä muistaa, että ihmisihon käyttöön liittyy kansallisia ja kansainvälisiä eettisiä näkökohtia ja ehtoja.

8. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan ihoärsyttävyyttä/-syövyttävyyttä koskevan B.4 menetelmän vaiheittaisen testausstrategian *in vitro* -ihoärsyttävyysosiota (OECD:n testiohje 404) (4). Vaikka tällä testimenetelmällä ei saada riittävästi tietoja ihosyövyttävyydestä, on syytä panna merkille, että ihosyövyttävyyttä koskeva B.40a menetelmä (OECD:n testiohje 431) perustuu samaan RhE-testijärjestelmään, mutta siinä käytetään muuta tutkimussuunnitelmaa (B.40a luku). Tässä selostettu menetelmä perustuu RhE-malleihin, joissa käytetään ihmisistä peräisin olevia keratinosyyttejä, jotka näin ollen edustavat tarkasteltavana olevan lajin kohde-elintä *in vitro*. Menetelmä kattaa suoraan myös aluksi esiintyvän tulehdusreaktion ja/tai reaktiomekanismin (soluvauriot ja paikalliseen vammaan johtavat kudosvauriot), joka tapahtuu *in vivo* -ärsytyksen aikana. Tämän testimenetelmän validoinnin yhteydessä on testattu useita erilaisia kemikaaleja, ja validointitutkimuksessa kerättyyn tietopankkiin käsittää yhteensä 58 kemikaalia (16) (18) (23). Menetelmää voidaan käyttää kiinteisiin aineisiin, nesteisiin, puolikiinteisiin aineisiin ja vahamaisiin aineisiin. Nesteet voivat olla vesiliuoksia tai orgaanisia liuoksia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan jauhettava hienoksi jauhoksi ennen applikointia; näytteen muuta esikäsittelyä ei vaadita. Kaasuja ja aerosoleja ei ole vielä arvioitu validointitutkimuksessa (24). Vaikka voidaan ajatella, että niitä voidaan testata RhE-tekniikalla, tällä testimenetelmällä kaasuja ja aerosoleja ei voida testata. On myös pantava merkille, että voimakkaanväriset kemikaalit voivat häiritä solujen elinkyvyn mittausta, joten on käytettävä mukautettuja kontrolleja (katso 24–26 kohta).

9. Kun testikemikaalin luokittelu on yksiselitteinen, se voidaan testata yhdessä kolme kudosnäytettä käsittävässä testiajossa. Jos luokittelu on vaikeaa, esimerkiksi jos rinnakkaisnäytteille saadut tulokset ovat erilaiset ja/tai jos keskimääräinen elinkyky on 50 ± 5 %, on harkittava toista testiajoa ja myös kolmatta, jos kahden ensimmäisen testin tulokset poikkeavat toisistaan.

▼M3

TESTIN PERIAATE

10. Testikemikaalia applikoidaan paikallisesti kolmiulotteiseen rekonstruoituun ihmisorvaskesimalliin, joka koostuu ihmisestä saaduista muuntamattomista orvaskeden keratinosyyteistä, jotka on viljelty ihmisen orvaskeden monikerroksiseksi, täysin erilaistuneitten solujen malliksi. Se koostuu järjestyneistä ja selkeistä tyvisolu-, okasolu- ja jyväiskerroksista ja monikerroksisesta marraskedestä, joka sisältää solujenvälisiä lamellaarisia lipidikerroksia, jotka edustavat lipidiluokkia, joita havaitaan myös *in vivo* -kokeissa.

11. Kemikaalien aiheuttama ihoärsytys, joka esiintyy eryteemana ja ödeemana, on seurauksena tapahtumasarjasta, joka käynnistyy, kun kemikaali läpäisee marraskeden, ja alla olevat keratinosyyttikerrokset vaurioituvat. Kuolevat keratinosyytit vapauttavat välittäjäaineita, jotka käynnistävät tulehdusreaktion, joka vaikuttaa verinahan soluihin, etenkin strooman ja endoteelin soluihin. Havaitut eryteema ja ödeema johtuvat endoteelin solujen laajentumisesta ja tavallista suuremmasta läpäisevyydestä (24). RhE-malliin perustuvilla menetelmillä mitataan tämän tapahtumasarjan käynnistäviä tapahtumia.

12. Solujen elinkyvyn mittaus perustuu siihen, että entsyymit muuntavat väriaine MTT:n (3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi, tiatsolyylisininen; CAS-numero 298-93-1) siniseksi formatsaanisuolaksi, joka mitataan kvantitatiivisesti, kun se on uutettu kudoksista (25). Ärsytystä aiheuttavat aineet tunnistetaan niiden kyvystä alentaa solun elinkykyä määritettyjen kynnysarvojen alle (ts. ≤ 50 % YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokan 2 osalta). Riippuen siitä sääntely-yhteydestä, jossa tämän testimenetelmän tuloksia käytetään, voidaan katsoa, että kemikaalit, jotka aiheuttavat määriteltyä kynnysarvoa korkeamman solujen elinkyvyn, eivät ole ärsyttäviä (ts. > 50 %, ei luokitusta).

PÄTEVYYDEN OSOITUS

13. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään rutiininomaisesti jotakin tämän testimenetelmän mukaisista kolmesta validoidusta menetelmästä, laboratorioiden on osoitettava tekninen pätevyytensä taulukossa 1 lueteltujen kymmenen vertailukemikaalin avulla. Tämän testimenetelmän mukaisesti kehitettyjen samanlaisten menetelmien tai kolmen validoidun menetelmän mukautusten osalta tämän testimenetelmän lisäyksessä 2 vahvistetut suoritusvaatimukset on täytettävä, ennen kuin niitä käytetään lainsäädännössä edellytettyihin testeihin.

14. Osana pätevyyden osoittamista käyttäjän on kudosten vastaanoton jälkeen tarkastettava kudosten läpäisevyysominaisuudet RhE-mallin laatijan vaatimusten mukaisesti. Tämä on erityisen tärkeää, jos kudoksia kuljetetaan pitkiä välimatkoja tai pitkiä aikoja. Kun menetelmä on otettu onnistuneesti käyttöön ja laboratorion pätevyys on osoitettu, tällaista tarkastusta ei tarvitse tehdä säännöllisesti. Jos menetelmää käytetään säännöllisesti, on läpäisevyysominaisuudet kuitenkin jatkossakin syytä arvioida säännöllisin väliajoin.

Taulukko 1

Vertailukemikaalit ([1])

Kemikaali	CAS-nro	*In vivo*-tulos ([2])	Fysikaalinen olomuoto	YK:n GHS-luokka / EU:n CLP-luokka
naftaleenietikkahappo	86-87-3	0	kiinteä	ei luokitusta
isopropanoli	67-63-0	0,3	neste	ei luokitusta

▼M3

Kemikaali	CAS-nro	*In vivo*-tulos ([2])	Fysikaalinen olomuoto	YK:n GHS-luokka / EU:n CLP-luokka
metyylistearaatti	112-61-8	1	kiinteä	ei luokitusta
heptyylibutyraatti	5870-93-9	1,7	neste	ei luokitusta (*valinnainen luokka 3*) ([3]) ([4])
heksyylisalisylaatti	6259-76-3	2	neste	ei luokitusta (*valinnainen luokka 3*) ([3]) ([4])
syklameenialdehydi	103-95-7	2,3	neste	luokka 2
1-bromiheksaani	111-25-1	2,7	neste	luokka 2
kaliumhydroksidi (5 % liuos vedessä)	1310-58-3	3	neste	luokka 2
1-metyyli-3-fenyyli-1-piperatsiini	5271-27-2	3,3	kiinteä	luokka 2
heptanaali	111-71-7	3,4	neste	luokka 2

([1]) Nämä vertailukemikaalit muodostavat osan validointitutkimuksessa käytettävistä vertailukemikaaleista.
([2]) *In vivo* -pisteytystulos B.4-menetelmän ja OECD:n testiohjeen 404 (4) mukaisesti.
([3]) Tässä testimenetelmässä katsotaan, että YK:n GHS-järjestelmän valinnainen luokka 3 (lievästi ärsyttävät aineet) (1) vastaa luokitusta ”ei luokitusta”.
([4]) YK:n GHS-järjestelmän valinnaista luokkaa 3 ei sovelleta EU:n CLP-asetuksessa.

MENETTELY

15. Seuraavassa esitellään RhE-menetelmää käyttävän ihoärsyttävyysarvioinnin osat ja menettelyt. RhE-malli on valmistettava, ja se voidaan valmistaa itse laboratoriossa tai hankkia kaupallisesti. EpiSkin™-menetelmän, EpiDerm™-ihoärsytystestin (EPI-200) ja SkinEthic™-RhE-menetelmän standardimenettelyt ovat saatavilla lähteissä (26) (27) (28). Testaus on toteutettava seuraavasti:

RhE-TESTIMENETELMÄN osat

Yleiset olosuhteet

16. Epiteelin valmistamiseen on käytettävä muuntamattomia ihmisen keratinosyyttejä. Toimivan marraskeden alla on oltava useita kerroksia eläviä epiteelisoluja (tyvisolukerros, okasolukerros ja jyväiskerros). Marraskedessä on oltava useita kerroksia ja olennainen lipidikoostumus, jotta se voi toimia esteenä solumyrkyllisten merkkiaineiden, kuten natriumdodekyylisulfaatin (SDS) tai Triton X-100:n, nopealle kulkeutumiselle ihokerrosten läpi. Läpäisynestokyky on osoitettava, ja se voidaan arvioida joko määrittämällä pitoisuus, jossa merkkiaine vähentää kudosten elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) tietyn altistusajan jälkeen, tai määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan solun elinkyvyn vähenemiseen 50 prosentilla (ET_{50}) applikoitaessa merkkiainetta tietyssä, tunnetussa pitoisuudessa. Mallin on oltava sellainen, ettei materiaali pääse marraskeden ympäri elävään kudokseen, koska se heikentäisi mallin kykyä mallintaa ihoaltistusta. RhE-mallissa ei saa olla kontaminaatiota (bakteerit, virukset, mykoplasmat tai sieni-itiöt).

▼M3

Toimintaolosuhteet

Solujen elinkyky

17. Solujen elinkyky määritetään MTT-määritysmenetelmällä (25). RhE-mallien käyttäjien on varmistettava, että kukin RhE-mallin erä täyttää negatiiviselle kontrollille asetetut vaatimukset. Pelkän uuttoliuottimen optisen tiheyden (OD) on oltava riittävän pieni, ts. OD < 0,1. RhE-mallin kehittäjän/tuottajan on määritettävä negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyyden vaihteluväli (ylempi ja alempi raja-arvo) (ihoärsytystestimenetelmän olosuhteissa). Kolmen validoidun menetelmän hyväksyttävyyden vaihteluvälit esitetään taulukossa 2. Negatiivisella kontrollikemikaalilla käsiteltyjen kudosten vakaus viljelmässä (niiden on annettava samanlaiset elinkykytulokset) testin altistusjakson ajan on dokumentoitava.

Taulukko 2

Negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyyden vaihteluväli

	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
EpiSkin™ (ihomalli)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™-ihoärsytystesti (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™-RhE-menetelmä	≥ 1,2	≤ 2,5

Läpäisyn esto

18. Marraskeden ja sen lipidikoostumuksen on oltava riittävä estämään solumyrkyllisten merkkiaineiden, esimerkiksi SDS:n tai Triton X-100:n, nopea läpäisy arvioituna IC_{50}:llä tai ET_{50}:llä (taulukko 3).

Morfologia

19. RhE-malli on tutkittava histologisesti, ja on osoitettava, että rekonstruktiolla on ihmisen orvaskeden kaltainen rakenne (myös monikerroksinen marraskesi).

Uusittavuus

20. Testimenetelmän positiivisella kontrollikemikaalilla ja negatiivisilla kontrolleilla saatujen tulosten olisi osoitettava tulosten uusittavuus pidemmällä aikavälillä.

Laadunvalvonta

21. RhE-mallin kehittäjän/tuottajan on varmistettava ja osoitettava, että kukin RhE-mallin erä täyttää määritellyt tuotantokriteerit, joiden joukosta *elinkykyisyyttä* (17 kohta), *läpäisyn estoa* (18 kohta) ja *morfologiaa* (19 kohta) koskevat perusteet ovat merkityksellisimmät. Tätä koskevat tiedot on annettava menetelmän käyttäjille, jotta he voivat ilmoittaa tiedot testiraportissa. RhE-mallin kehittäjän/tuottajan (tai laitoksen omaa mallia käytettäessä tutkijan) on annettava IC_{50}:n tai ET_{50}:n hyväksyttävyyden vaihteluväli (ylempi ja alempi raja-arvo). Ainoastaan hyväksytyillä kudoksilla saadut tulokset voidaan hyväksyä luotettavaksi ennusteeksi ärsytyksen luokittelua varten. Edellä käsiteltyjen kolmen validoidun menetelmän hyväksyttävyyden vaihteluvälit esitetään esimerkkeinä taulukossa 3.

▼M3

Taulukko 3

Esimerkkejä laadunvalvonnan perusteista erän vapauttamiseksi tehtaalta myyntiin

	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
EpiSkin™ (ihomalli) (18 tunnin käsittely SDS:llä) (26)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™-ihoärsytystesti (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET_{50} = 4,8 tuntia	ET_{50} = 8,7 tuntia
SkinEthic™-RhE-menetelmä (1 % Triton X-100) (28)	ET_{50} = 4,0 tuntia	ET_{50} = 9,0 tuntia

Testi- ja kontrollikemikaalien annostelu

22. Kutakin testikemikaalia ja kunkin käsittelyn kontrollia kohti on käytettävä vähintään kolmea näytettä. Sekä nestemäisiä että kiinteitä aineita käytettäessä orvaskeden pinnalle on annosteltava testikemikaalia tasaisesti riittävä määrä kuitenkin niin, ettei käytetä hyvin suurta annosta. Kemikaalia olisi käytettävä vähintään 25 µl/cm^2 tai 25 mg/cm^2. Kiinteitä aineita käytettäessä orvaskeden pinta on kostutettava deionisoidulla tai tislatulla vedellä ennen aineen annostelua, jotta testikemikaalin ja orvaskeden pinnan välistä kosketus olisi parempi. Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan testattava hienona jauheena. Altistuksen jälkeen testikemikaali on huuhdeltava huolellisesti orvaskeden pinnalta sopivalla vesipitoisella puskuriliuoksella tai 0,9-prosenttisella NaCl:lla. Kolmesta validoidusta RhE-menetelmästä valitusta menetelmästä riippuen altistusaika voi olla 15–60 minuuttia ja inkubaatiolämpötila 20–37 °C. Nämä altistusajat ja lämpötilat on optimoitu erikseen kullekin RhE-menetelmälle, ja ne vastaavat menetelmien erilaisia ominaispiirteitä; lisätietoja on saatavilla menetelmien standardimenettelyistä (26) (27) (28).

23. Kussakin käsittelyssä on käytettävä samanaikaisesti negatiivisia ja positiivisia kontrolleja osoittamaan, että solujen elinkyky (negatiivisella kontrollilla), läpäisyn esto ja altistuksesta seuraava kudoksen herkistyminen (positiivisella kontrollilla) ovat pidemmän ajan kuluessa määritetyllä hyväksyttävyyden vaihteluvälillä. Positiivisena kontrolliaineena suositellaan käytettäväksi 5-prosenttista SDS:n vesiliuosta. Suositeltavat negatiiviset kontrollikemikaalit ovat vesi tai fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS).

Solujen elinkykymittaukset

24. Tärkeintä testimenettelyssä on se, että elinkykymittauksia ei suoriteta heti testikemikaaleille altistumisen jälkeen, vaan vasta, kun kudokset on käsittelyn jälkeen huuhdeltu ja ne ovat olleet riittävän pitkän inkubaatioajan tuoreessa elatusaineessa. Inkubaatioaika mahdollistaa sekä palautumisen heikoista sytotoksisista vaikutuksista että selkeiden sytotoksisten vaikutusten esilletulon. Testin optimointivaiheessa (11) (12) (13) (14) (15) on käynyt ilmi, että 42 tuntia kestävä inkubaatioaika käsittelyn jälkeen on optimaalinen.

25. MTT-määritysmenetelmä on validoitu kvantitatiivinen menetelmä, jota olisi käytettävä solujen elinkyvyn mittaamiseen tässä testimenetelmässä. MTT-menetelmä sopii käytettäväksi kolmiulotteisen kudosrakenteen kanssa. Kudosnäyte pannaan kolmeksi tunniksi sopivan vahvuiseen MTT-liuokseen (esimerkiksi 0,3–1 mg/ml). Saostunut sininen formatsaani uutetaan kudoksesta liuottimella (esimerkiksi isopropanoli tai hapan isopropanoli), ja formatsaanipitoisuus määritetään mittaamalla OD-arvo 570 ± 30 nm:ssä.

▼M3

26. Testikemikaalin optiset ominaisuudet tai sen kemiallinen reaktio MTT:n kanssa voivat aiheuttaa sen, että määritysmenetelmällä saadaan väärä arvio elinkyvystä (koska testikemikaali voi estää värin muodostumisen tai vaihtoehtoisesti aiheuttaa sen). Näin voi tapahtua, jos tietty testikemikaali ei kokonaan poistu kudoksesta huuhtelemalla tai jos se imeytyy orvasketeen. Jos testikemikaali reagoi suoraan MTT:n kanssa (MTT-pelkistin), on luonnostaan värillinen tai värjäytyy kudoksen käsittelyn aikana, on käytettävä lisäkontrolleja, jotta testikemikaalin vaikutus solujen elinkyvyn mittaukseen voidaan osoittaa ja korjata. MTT:n suoran pelkistyksen ja väriaineiden aiheuttamien häiriöiden korjaamismenettelyt selostetaan yksityiskohtaisesti kyseisiä kolmea validoitua menetelmää koskevissa standardimenettelyissä (26) (27) (28).

Hyväksyttävyysperusteet

27. Jokaisessa menetelmässä, jossa käytetään validoidun RhE-mallin eriä (katso 21 kohta), negatiivisella kontrollikemikaalilla käsiteltyjen kudosten OD:n vastattava sellaisten kudosten OD:tä, joille on suoritettu kaikki kuljetus- ja vastaanottovaiheet sekä kaikki tutkimussuunnitelman menettelyt. Kontrollien OD-arvot eivät saa olla alhaisemmat kuin pitkähkön aiemman ajanjakson alemmat rajat. Vastaavasti positiivisella kontrollilla eli 5-prosenttisella SDS:n vesiliuoksella käsiteltyjen kudosten on ilmennettävä kudosten kykyä reagoida ärsytystä aiheuttavaan kemikaaliin tässä testimenetelmässä (26) (27) (28). Rinnakkaisten kudosnäytteiden välisen vaihtelun asianmukaiset määrät on määriteltävä (esimerkiksi jos käytetään vakiopoikkeamia, niiden on oltava aiempien tietojen perusteella lasketun 1-puolisen 95 prosentin vaihteluvälin sisällä; validoiduille vertailumenetelmille vakiopoikkeama < 18 %).

Tulosten tulkinta ja ennustettavuusmalli

28. Negatiivisen kontrollin OD-arvon katsotaan testissä edustavan 100-prosenttista solujen elinkykyä. Kullakin testikemikaalilla saaduista OD-arvoista voidaan laskea solujen elinkyky prosentteina negatiivisesta kontrollista. Prosentuaalinen solujen elinkyvyn raja-arvo, jolla ärsyttävät testikemikaalit erotetaan luokittelemattomista testikemikaaleista, ja tulosten arviointiin ja ärsyttävien kemikaalien tunnistamiseen käytettävät tilastomenetelmät on määriteltävä selvästi ja dokumentoitava ja niiden sopivuus on osoitettava. Ärsytyksen ennusteen raja-arvot esitetään seuraavassa:

— Testikemikaalin katsotaan aiheuttavan ärsytystä iholla YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokan 2 mukaisesti, jos kudoksen elinkyky altistuksen ja käsittelyn jälkeisen inkubaation jälkeen on alhaisempi tai yhtä suuri kuin (≤) 50 prosenttia.

— Riippuen siitä, minkä säädöksen noudattaminen tulee kysymykseen tämän testimenetelmän yhteydessä, voidaan katsoa, että testikemikaali ei aiheuta ärsytystä iholla YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokituksen ”ei luokitusta” mukaisesti, jos kudoksen elinkyky altistuksen ja käsittelyn jälkeisen inkubaation jälkeen on suurempi kuin (>) 50 prosenttia.

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Mittaustulokset

29. Kunkin testin osalta on esitettävä taulukkomuodossa yksittäisiä rinnakkaisia testinäytteitä koskevat mittaustulokset (esimerkiksi kunkin testikemikaalin OD-arvot ja solujen elinkyvyn prosentuaalista osuutta koskevat tiedot, mukaan luettuna luokittelu) ja tarvittaessa myös mittaustulokset toistetuista kokeista. Lisäksi on esitettävä kunkin käsittelyn keskiarvo ± keskihajonta. Kunkin testikemikaalin osalta on esitettävä havaittu vuorovaikutus MTT-reagenssin ja värillisten testikemikaalien kanssa.

▼**M3**

Testiraportti

30. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrollikemikaalit

— kemiallinen nimi/kemialliset nimet, kuten CAS-nimi ja -numero sekä EC-nimi ja -numero, jos ne tiedetään,

— kemikaalin puhtaus ja koostumus (painoprosentteina),

— tutkimuksen suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikaaliskemialliset ominaisuudet (kuten fysikaalinen olomuoto, stabiilius ja haihtuvuus, pH ja vesiliukoisuus, jos se tiedetään),

— tarvittaessa testi- tai kontrollikemikaalien käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen),

— varastointiolosuhteet.

Käytetyn RhE-mallin ja testisuunnitelman perustelut

Testiolosuhteet

— käytetty solujärjestelmä,

— täydelliset RhE-mallin käyttöä tukevat tiedot (mukaan luettuna mallin suoritusarvot). Näitä voivat olla, luettelon olematta tyhjentävä,

  i) solujen elinkyky

  ii) läpäisyn esto

  iii) morfologia

  iv) uusittavuus ja ennustettavuus

  v) mallin laatukontrollit,

— tiedot käytetystä testimenettelystä,

— testissä käytetyt annokset, altistuksen kesto ja käsittelyn jälkeinen inkubaatioaika,

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista,

— viittaukset mallia koskeviin aiempiin tietoihin. Näitä voivat olla, luettelon olematta tyhjentävä,

  i) laatukontrollitietojen hyväksyttävyys; viitattava aikaisempia eriä koskeviin tietoihin

  ii) positiivisten ja negatiivisten kontrollien hyväksyttävyys; viitattava positiivisten ja negatiivisten kontrollien keskiarvoihin ja vaihteluväleihin,

— käytettyjen arviointiperusteiden kuvaus, mukaan luettuina ennustettavuusmallin raja-arvojen valinnan perusteet,

— viittaukset aiempiin kontrollitietoihin.

▼**M3**

Tulokset

— yksittäisistä testikemikaaleista saadut tulokset kussakin testiajossa ja rinnakkaisista mittauksista taulukkomuodossa,

— tiedot kontrolleista, joita on käytetty suorille MTT:n pelkistimille ja/tai värjääville testikemikaaleille,

— kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDELUETTELO

(1) YK (2009). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). 3. tarkistettu painos. YK, New York ja Geneve. Saatavilla osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html

(2) EC-ECVAM (2009). Statement on the ”Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards”. ECVAM:in tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC30), 9. huhtikuuta 2009. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(3) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta. EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

(4) OECD (2004). Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(5) OECD (2004). *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(6) OECD (2004). *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(7) OECD (2006). *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(8) EC-ECVAM (2009). Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(10) Fentem, J. H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J. J. M. ja Botham, P. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team. Toxicol. in Vitro 15, s. 57–93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. ja Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. Toxicol. in Vitro 16, s. 765–770.

▼M3

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. ja Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. ALTEX 21, s. 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. ja Spielmann, H. (2005). The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test. ATLA 33, s. 351–367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. ja Rubinsteen, G. (2005). The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process. ATLA 33, s. 329–349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R. D., Elliot, G. R., Fentem, J. H., Heylings, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J. J. M., Wiemann, C. ja Worth, A. (2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2. ATLA 30, s. 109–129.

(16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. ja Zuang, V. (2007). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test. ATLA 35, s. 559–601.

(17) Hoffmann, S. (2006). ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. ja Zuang, V. (2007). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals. ATLA 35, s. 603–619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. ja Leclaire, J. (2007). *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy – Results and performances with 184 cosmetic ingredients. AATEX 14, s. 351–358.

(20) EC-ECVAM (2007). Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation. ECVAM:in tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC26), 27. huhtikuuta 2007. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(21) EC-ECVAM (2007). Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(22) EC-ECVAM (2008). Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing. ECVAM:in tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC29), 5. marraskuuta 2008. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(23) OECD (2010). Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html

(24) Welss, T., Basketter, D. A. ja Schröder, K. R. (2004). *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models. Toxicol. in Vitro 18, s. 231–243.

▼**M3**

(25) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, s. 55–63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (helmikuu 2009). ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (tarkistettu versio, maaliskuu 2009). Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (helmikuu 2009). SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(29) Harvell, J. D., Lamminstausta, K. ja Maibach, H. I. (1995). Irritant contact dermatitis. Practical Contact Dermatitis, s. 7–18 (Toim. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Komission direktiivi 2001/59/EY, annettu 6 päivänä elokuuta 2001, vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen kahdennenkymmenennenkahdeksannen kerran. EYVL L 225, 21.8.2001, s. 1.

(31) Basketter, D. A., York, M., McFadden, J. P. ja Robinson, M. K. (2004). Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, s. 1–4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. ja Kandarova, H. (2007). Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data. ALTEX 14, s. 359–365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. ja Kandárová, H. (2010). Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data. Contact Dermatitis 62, s. 109–116.

▼M3

Lisäys 1

Määritelmät

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssia) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (9).

Solujen elinkyky: Muuttuja, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta, esimerkiksi solujen mitokondrioiden dehydrogenaasien kykyä pelkistää väriaine MTT (3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi eli tiatsolyylisininen), joka mitatusta päätepisteestä ja testimenetelmästä riippuen korreloi solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn.

Vastaavuus: Testimenetelmän suorituskyvyn mitta sellaisille testimenetelmille, joiden tulokset ovat luokittelevia, ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Vastaavuutta ja tarkkuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti, ja vastaavuus on määritelty kaikkien niiden testikemikaalien osuudeksi, jotka on luokiteltu oikein positiivisiksi tai negatiivisiksi (9).

ET_{50}: Voidaan arvioida määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan, jotta solujen elinkyky vähenee 50 prosenttia annosteltaessa merkkikemikaalia tietyssä, määrätyssä pitoisuudessa; katso myös IC_{50}.

EU:n CLP-asetus (aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta 16 päivänä joulukuuta 2008 annettu Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008): Kemikaalien (aineiden ja seosten) luokittelua ja merkintöjä koskeva YK:n GHS-järjestelmä saatetaan tällä asetuksella osaksi Euroopan unionin (EU) lainsäädäntöä (3).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals; Yhdistyneiden kansakuntien (YK) kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

IC_{50}: Voidaan arvioida määrittämällä pitoisuus, jossa merkkikemikaali alentaa solujen elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) sovitun altistusajan jälkeen; katso myös ET_{50}.

Rajoittamaton annos: Orvasketeen applikoidun testikemikaalin määrä, joka ylittää määrän, joka tarvitaan orvaskeden pinnan peittämiseksi kokonaisuudessaan ja tasaisesti.

Me-too-testi: Puhekielinen nimitys testimenetelmälle, joka on rakenteellisesti ja funktionaalisesti samanlainen kuin validoitu ja hyväksytty vertailutestimenetelmä. Tällainen menetelmä voitaisiin myös validoida. Tarkoittaa samaa kuin samanlainen testimenetelmä (9).

Suoritusvaatimukset: Validoituihin vertailumenetelmiin perustuvat standardit, jotka toimivat perustana arvioitaessa ehdotetun mekaanisesti ja toiminnallisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Siihen sisältyvät i) testimenetelmän oleelliset osat; ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) vertailukelpoiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (9).

▼**M3**

Vertailukemikaalit: Validointimenettelyyn valitut kemikaalit, joiden vasteet *in vitro*- tai *in vivo* -vertailutestijärjestelmässä tai kyseisessä lajissa ovat tiedossa. Näiden kemikaalien olisi edustettava niitä kemikaaliluokkia, joita testattaessa kyseistä testimenetelmää todennäköisesti käytetään, ja niiden on edustettava kaikkia niitä vasteita, joita tällä testimenetelmällä testattavilta kemikaaleilta voidaan odottaa (voimakkaista lieviin ja negatiivisiin). Validointimenettelyn eri vaiheita sekä eri testimenetelmiä ja testitarkoituksia varten voidaan vaatia erilaisia vertailukemikaaleja (9).

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (9).

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on uusittavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa menettelyä. Se arvioidaan laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus (9).

Korvaava testi: Testi, jolla voidaan korvata testi, joka on säännöllisesti käytössä ja joka on hyväksytty vaarallisuuden määrittämiseen ja/tai riskien arviointiin, ja jonka on osoitettu antavan ihmisten tai eläinten terveyden tai tarvittaessa ympäristön kannalta vastaavan tai korkeamman suojelutason hyväksyttyyn testiin verrattuna kaikissa mahdollisissa testaustilanteissa ja kaikkien kemikaalien yhteydessä (9).

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (9).

Ihoärsyttävyys: Palautuvan ihovaurion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testikemikaalin annostelun jälkeen. Ihoärsytys on paikallisesti esiintyvä, ei-immunogeeninen reaktio, joka kehittyy pian stimulaation jälkeen (29). Sen tärkeimmät ominaispiirteet ovat sen palautuvuus, johon liittyy tulehdusreaktioita, ja useimmat tulehdusreaktioon liittyvät ärsyttävyyden kliiniset ominaispiirteet (eryteema, ödeema, kutina ja kipu).

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. On tärkeää ottaa spesifisyys huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (9).

Vaiheittainen testausstrategia: Testaus, jossa testimenetelmiä käytetään peräkkäin; testimenetelmät valitaan kullekin peräkkäiselle tasolle edellisen testaustason tulosten perusteella (9).

Testikemikaali (testiaine): Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

▼M3

Lisäys 2

Suoritusvaatimukset ehdotettujen samanlaisten tai mukautettujen rekonstruoituun ihmisorvasketeen (RhE) perustuvien ihoärsytyksen *in vitro* -menetelmien arviointia varten

JOHDANTO

1. Suoritusvaatimuksien tarkoituksena on antaa perusta, jolla voidaan määrittää, ovatko yksinoikeudelliset (eli tekijänoikeudelliset, tavaramerkityt tai rekisteröidyt) ja muut kuin yksinoikeudelliset uudet menetelmät riittävän täsmällisiä ja luotettavia tiettyjä testaustarkoituksia varten. Näitä validoituihin ja hyväksyttyihin testimenetelmiin perustuvia suoritusvaatimuksia voidaan käyttää muiden samanlaisten menetelmien (niin sanottujen me-too-testien) luotettavuuden ja täsmällisyyden arviointiin, kun kyseiset menetelmät perustuvat vastaaviin tieteellisiin periaatteisiin ja niillä mitataan tai ennakoidaan samanlaista biologista tai toksista vaikutusta (9).

2. Ennen mukautettujen menetelmien (eli hyväksytyn menetelmän mahdollisten parannusehdotusten) hyväksymistä on arvioitava ehdotettujen muutosten vaikutus testin suorittamiseen ja se, missä määrin kyseiset muutokset vaikuttavat validointimenettelyn muita osia varten saatavilla oleviin tietoihin. Ehdotettujen muutosten määrän ja luonteen, saatujen tietojen ja kyseisiä muutoksia tukevan aineiston mukaisesti ne on joko validoitava samalla tavalla kuin uusi testi tai, mikäli se on asianmukaista, niiden luotettavuus ja merkityksellisyys on arvioitava suppeammin käyttämällä vakiintuneita suoritusvaatimuksia (9).

3. Tätä testiä varten käytettäväksi ehdotettujen kolmen validoidun menetelmän (EpiSkin™ (validoitu vertailumenetelmä – VVM), EpiDerm™-ihoärsytystesti (EPI-200) ja SkinEthic™-RhE-menetelmä) samanlaisten (me-too-menetelmät) tai mukautettujen menetelmien luotettavuus ja täsmällisyys on määritettävä käyttämällä kemikaaleja, jotka edustavat koko Draizen ihoärsytyksen pisteytysasteikkoa. Kun ehdotettu menetelmä arvioidaan käyttämällä suoritusvaatimuksissa suositeltuja 20:tä vertailukemikaalia (taulukko 1), ehdotettujen samanlaisten tai mukautettujen menetelmien luotettavuus- ja tarkkuusarvojen on vastattava VVM:stä saatuja arvoja tai oltava niitä parempia (taulukko 2) (2) (16). Luotettavuus- ja tarkkuusarvot, jotka on saavutettava, esitetään tässä lisäyksessä olevissa 8–12 kohdassa. Vertailukemikaaleissa on mukana luokittelemattomia (YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen ”ei luokitusta”) ja luokiteltuja (YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokka 2) (1), erilaisia kemikaaliluokkia edustavia kemikaaleja, joten ehdotetun menetelmän luotettavuutta ja tarkkuutta (herkkyyttä, spesifisyyttä ja yleistä tarkkuutta) VVM:n luotettavuuteen ja tarkkuuteen voidaan verrata. Menetelmän luotettavuus sekä sen kyky tunnistaa oikein YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokkaan 2 kuuluvat ärsytystä aiheuttavat kemikaalit sekä – riippuen siitä säännöstöstä, jota varten tietoja tuotetaan – myös sen kyky tunnistaa oikein YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokkaan ”ei luokitusta” kuuluvat kemikaalit olisi määritettävä, ennen kuin menetelmää käytetään uusien testikemikaalien testaamiseen.

4. Nämä suoritusvaatimukset perustuvat EC-ECVAM:in suoritusvaatimuksiin (8), jotka on saatettu ajan tasalle luokitusta ja merkintöjä koskevien YK:n GHS-järjestelmän ja EU:n CLP-asetuksen mukaisesti (1) (3). Alkuperäiset suoritusvaatimukset määriteltiin validointitutkimuksen (21) suorittamisen jälkeen, ja ne perustuivat EU:n luokittelujärjestelmään, josta säädetään vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen kahdennenkymmenennenkahdeksannen kerran 6 päivänä elokuuta 2001 annetulla komission direktiivillä 2001/59/EY ([1]). Koska YK:n GHS-järjestelmä

([1]) EYVL L 225, 21.8.2001, s. 1.

▼M3

hyväksyttiin EU:n luokitus- ja merkintäjärjestelmäksi (EU:n CLP-asetus) (3) validointitutkimuksen päätökseen saattamisen ja tämän testimenetelmän lopullisen version laatimisen välisenä aikana, suoritusvaatimuksia on saatettu ajan tasalle (8). Nämä ajan tasalle saattamiseksi tehtävät tarkistukset koskevat pääasiassa muutoksia i) suoritusvaatimuksissa mainituissa vertailukemikaaleissa ja ii) määriteltyjä luotettavuus- ja tarkkuusarvoja (2) (23).

SUORITUSVAATIMUKSET REKONSTRUOITUUN IHMISORVASKETEEN (RhE) PERUSTUVIA IHOÄRSYTYKSEN *IN VITRO* -TESTIMENETELMIÄ VARTEN

5. Suoritusvaatimukset koostuvat seuraavista kolmesta osasta (9):

I) testimenetelmän oleelliset osat

II) vertailukemikaalien vähimmäisluettelo

III) määritellyt luotettavuus- ja tarkkuusarvot

I) **Testimenetelmän oleelliset osat**

6. Nämä koostuvat validoidun menetelmän oleellisista rakenteellisista, toiminnallisista ja menettelyihin liittyvistä osista, jotka on sisällytettävä ehdotetun mekaanisesti tai toiminnallisesti samanlaisen tai mukautetun menetelmän testisuunnitelmaan. Näitä osia ovat vain kyseisellä menetelmällä olevat ominaisuudet, menettelyihin liittyvät ratkaisevan tärkeät yksityiskohdat sekä laadunvalvontamenettelyt. Testimenetelmän oleellisia osia koskevia vaatimuksia noudattamalla varmistetaan, että ehdotettu samanlainen tai mukautettu menetelmä perustuu samoihin tekijöihin kuin vastaava VVM (9). Testimenetelmän oleelliset osat kuvataan yksityiskohtaisesti testimenetelmän 16–21 kohdassa, ja testaus olisi tehtävä seuraavien kohtien mukaisesti:

— yleiset ehdot (16 kohta)

— funktionaaliset ehdot, joihin kuuluvat

  — solujen elinkyky (17 kohta),

  — läpäisyn esto (18 kohta),

  — morfologia (19 kohta),

  — uusittavuus (20 kohta) ja

  — laadunvalvonta (21 kohta).

II) **Vertailukemikaalien vähimmäisluettelo**

7. Vertailukemikaalien avulla määritetään, onko ehdotettu samanlainen tai mukautettu menetelmä, joka on osoitettu rakenteellisesti ja toiminnallisesti riittävän samanlaiseksi VVM:ään verrattuna, tai joka on jonkin edellä mainituista kolmesta validoidusta menetelmästä vähäinen mukautus, yhtä luotettava ja tarkka tai luotettavampi tai tarkempi kuin VVM (2) (8) (16) (23). Taulukossa 1 lueteltuihin 20 suositeltuun vertailukemikaaliin on sisällytetty kemikaaleja erilaisista kemiallisista luokista (eli funktionaalisiin ryhmiin perustuvista kemikaaliluokista), ja ne edustavat koko Draizen ihoärsytyksen pisteytysasteikkoa (ärsyttämättömästä erittäin ärsyttävään). Luetteloon on sisällytetty kymmenen YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokan 2 kemikaalia ja kymmenen luokittelematonta kemikaalia, joista kolme on YK:n GHS-järjestelmän valinnaisen luokan 3 kemikaaleja. Tässä testimenetelmässä valinnainen luokka 3 katsotaan luokaksi ”ei luokitusta”. Taulukossa 1 luetellut kemikaalit on valittu esivalidointia seuraavassa optimointivaiheessa ja VVM:n validointitutkimuksessa käytetyistä kemikaaleista niin, että huomioon on otettu kemiallinen funktionaalisuus ja fysikaalinen olomuoto (14) (18). Nämä vertailukemikaalit edustavat niiden kemikaalien vähimmäismäärää, joita on käytettävä ehdotetun

▼M3

samanlaisen tai mukautetun menetelmän tarkkuuden ja luotettavuuden arvioimiseksi. Niitä ei kuitenkaan pidä käyttää uusien menetelmien kehittämiseksi. Jos lueteltu kemikaali ei ole saatavilla, myös muita kemikaaleja voidaan käyttää, jos niistä on saatavilla asianmukaiset *in vivo* -vertailutiedot. Tällaiset kemikaalit on valittava ensisijaisesti niistä kemikaaleista, joita on käytetty esivalidointia seuraavassa optimointivaiheessa tai VVM:n validointitutkimuksessa. Vertailukemikaalien vähimmäisluetteloon voidaan tarvittaessa lisätä muita kemikaaliluokkia edustavia kemikaaleja, joista on saatavilla asianmukaiset *in vivo* -vertailutiedot, jotta ehdotetun menetelmän tarkkuutta voidaan arvioida yksityiskohtaisemmin.

Taulukko 1

Samanlaisten tai mukautettujen RhE-ihoärsytysmenetelmien tarkkuus- ja luotettavuusarvojen määrittämisessä käytettävien vertailukemikaalien vähimmäisluettelo ([1])

Kemikaali	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo*-tulos	VRM *in vitro*-luokka	YK GHS / EU CLP *in vivo*-luokka
1-bromi-4-klooributaani	6940-78-9	neste	0	luokka 2	ei luokitusta
dietyyliftalaatti	84-66-2	neste	0	ei luokitusta	ei luokitusta
naftaleenietikkahappo	86-87-3	kiinteä	0	ei luokitusta	ei luokitusta
allyylifenoksiasetaatti	7493-74-5	neste	0,3	ei luokitusta	ei luokitusta
isopropanoli	67-63-0	neste	0,3	ei luokitusta	ei luokitusta
4-(metyylitio)-bentsaldedydi	3446-89-7	neste	1	luokka 2	ei luokitusta
metyylistearaatti	112-61-8	kiinteä	1	ei luokitusta	ei luokitusta
heptyylibutyraatti	5870-93-9	neste	1,7	ei luokitusta	ei luokitusta
heksyylisalisylaatti	6259-76-3	neste	2	ei luokitusta	ei luokitusta
kanelialdehydi	104-55-2	neste	2	luokka 2	ei luokitusta (*valinnainen luokka 3*) ([3])
1-dekanoli ([2])	*112-30-1*	*neste*	*2,3*	*luokka 2*	*luokka 2*
syklameenialdehydi	103-95-7	neste	2,3	luokka 2	luokka 2
1-bromiheksaani	111-25-1	neste	2,7	luokka 2	luokka 2
2-kloorimetyyli-3,5-dimetyyli-4-metoksipyridiinihydrokloridi	86604-75-3	kiinteä	2,7	luokka 2	luokka 2
di-n-propyylidisulfidi ([2])	*629-19-6*	*neste*	*3*	*ei luokitusta*	*luokka 2*
kaliumhydroksidi (5 % liuos vedessä)	1310-58-3	neste	3	luokka 2	luokka 2
bentseenitioli, 5-(1,1-dimetyylietyyli)-2-metyyli-	7340-90-1	neste	3,3	luokka 2	luokka 2
1-metyyli-3-fenyyli-1-piperatsiini	5271-27-2	kiinteä	3,3	luokka 2	luokka 2

▼M3

Kemikaali	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo*-tulos	VRM *in vitro*-luokka	YK GHS / EU CLP *in vivo*-luokka
heptanaali	111-71-7	neste	3,4	luokka 2	luokka 2
tetrakloorietyleeni	127-18-4	neste	4	luokka 2	luokka 2

([1]) Kemikaalit valitaan seuraavin perustein: i) kemikaalit ovat kaupallisesti saatavilla; ii) ne edustavat koko Draizen ärsyttävyyspisteytysasteikkoa (ärsyttämättömästä erittäin ärsyttävään); iii) niiden kemiallinen rakenne on tarkkaan määritetty; iv) niiden kemiallinen funktio on sama kuin validointiprosessissa käytettyjen kemikaalien; ja v) niillä ei ole erittäin toksisia ominaisuuksia (esimerkiksi karsinogeenisia tai lisääntymisjärjestelmälle myrkyllisiä ominaisuuksia), eivätkä niiden loppusijoituskustannukset saa olla niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön.

([2]) Kemikaalit, jotka aiheuttavat ärsytystä kanille mutta jotka luotettavien todisteiden mukaan eivät aiheuta ärsytystä ihmisille (31) (32) (33).

([3]) YK:n GHS-järjestelmässä, ei EU:n CLP-asetuksessa

III) **Määritellyt luotettavuus- ja tarkkuusarvot**

8. Kun ehdotettuja samanlaisia tai mukautettuja menetelmiä on tarkoitus käyttää monissa laboratorioissa, on luotettavuuden ja merkityksellisyyden määrittämiseksi kaikki taulukossa 1 esitetyt 20 vertailukemikaalia testattava vähintään kolmessa laboratoriossa. Jos ehdotettua menetelmää aiotaan käyttää vain yhdessä laboratoriossa, ei validointiin vaadita useissa laboratorioissa tehtävää testausta. On kuitenkin tärkeää, että kansainvälisesti tunnustetut validointielimet arvioivat kyseisiä validointitutkimuksia riippumattomasti kansainvälisten ohjeiden mukaisesti (9). Kaikki 20 vertailukemikaalia on testattava kussakin laboratoriossa kolmella erillisellä testiajolla, jotka suoritetaan eri kudosnäytteillä ja riittävän pitkän ajan kuluttua toisistaan. Kussakin testiajossa on testattava samanaikaisesti vähintään kolme rinnakkaista kudosnäytettä jokaista testattavaa testikemikaalia sekä negatiivista kontrollikemikaalia ja positiivista kontrollikemikaalia kohti.

9. Ehdotetun menetelmän luotettavuus- ja tarkkuusarvot on laskettava niin, että huomioon otetaan seuraavat neljä perustetta, ja on varmistettava, että luotettavuus- ja tarkkuusarvot lasketaan ennalta määritetyllä ja johdonmukaisella tavalla:

   1. Vain täydellisistä testeistä saatuja tietoja voidaan käyttää menetelmän laboratorionsisäisen ja laboratorioidenvälisen vaihtelun ja ennustettavuuden (tarkkuuden) laskemiseksi.

   2. Kunkin osallistuvan laboratorion kunkin vertailukemikaalin lopullinen luokittelu on tehtävä käyttämällä täydellisen testin eri testikerroilla saatujen solujen elinkyvyn arvojen keskiarvoa.

   3. Vain sellaisista kemikaaleista saadut tiedot, joille on tehty täydelliset testit kaikissa osallistuvissa laboratorioissa, voidaan ottaa huomioon laskettaessa menetelmän laboratorioidenvälistä vaihtelua.

   4. Tarkkuusarvot on laskettava osallistuvissa laboratorioissa 20 vertailukemikaalille tuotettujen yksittäisten laboratorioennusteiden perusteella.

   Tässä yhteydessä **testikerta** (testiajo) koostuu tietyn laboratorion tietylle testikemikaalille tekemästä kolmesta riippumattomasta testauksesta. **Täydellisellä testiajolla** tarkoitetaan tietyssä laboratoriossa tietylle testikemikaalille tehtyä testiä, jonka kaikki kolme ajoa ovat valideja. Tämä tarkoittaa, että yksikin hylätty ajo/testikerta johtaa koko kolmesta testiajosta koostuvan täydellisen testiajon hylkäämiseen.

Laboratorionsisäinen uusittavuus

10. Laboratorion sisäisen uusittavuuden arvioinnilla on osoitettava, että tietyssä laboratoriossa 20 vertailukemikaalilla suoritetut yksittäisillä, erillisillä testikerroilla saadut luokittelut vastaavat vähintään 90-prosenttisesti YK:n GHS-järjestelmän tai EU:n CLP-asetuksen luokitusta (luokka 2 tai ei luokitusta).

▼M3

Laboratorioidenvälinen uusittavuus

11. Laboratorioidenvälisen uusittavuuden arviointi ei ole tarpeen, jos ehdotettua menetelmää aiotaan käyttää vain yhdessä laboratoriossa. Jotta menetelmiä voitaisiin käyttää useissa laboratorioissa, mieluiten kolmessa eri laboratoriossa 20 vertailukemikaalilla suoritetuilla yksittäisillä, erillisillä testikerroilla saatujen luokitusten olisi vastattava vähintään 80-prosenttisesti YK:n GHS-järjestelmän tai EU:n CLP-asetuksen luokitusta (luokka 2 tai ei luokitusta).

Ennustettavuusi (tarkkuus)

12. Ehdotetun samanlaisen tai mukautetun menetelmän tarkkuuden (herkkyyden, spesifisyyden ja yleisen tarkkuuden) on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin VVM:n, kun kohdelajin osalta otetaan huomioon täydentävät merkityksellisyyttä koskevat tiedot (taulukko 2). Herkkyyden on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin (≥) 80 prosenttia (2) (8) (23). Ehdotetun *in vitro* -menetelmän herkkyyteen sovelletaan kuitenkin erityistä rajoitusta: vain kaksi luokkaan 2 kuuluvaa *in vivo* -kemikaalia, *1-dekanoli* ja *di-n-propyylidisulfidi,* saadaan luokitella väärin useammassa kuin yhdessä osallistuvassa laboratoriossa. Spesifisyyden on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin (≥) 70 prosenttia (2) (8) (23). Ehdotetun *in vitro* -menetelmän spesifisyyteen ei sovelleta muita rajoituksia. Toisin sanoen mikä tahansa osallistuva laboratorio saa luokitella ei luokitusta -luokkaan kuuluvan *in vivo* -kemikaalin väärin edellyttäen, että testimenetelmän lopullinen spesifisyys on hyväksyttävällä vaihteluvälillä. Yleisen tarkkuuden on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin (≥) 75 prosenttia (2) (8) (23). Vaikka taulukossa 1 lueteltujen vertailukemikaalien perusteella lasketun VVM:n herkkyys on yhtä suuri kuin 90 prosenttia, samanlaisen tai mukautetun menetelmän hyväksymiseen vaadittu herkkyyden vähimmäisarvo on määritetty 80 prosentiksi, koska tiedetään, että *1-dekanoli* (kemikaalina rajatapaus) ja *di-n-propyylidisulfidi* (VVM:n väärä negatiivinen) eivät aiheuta ärsytystä ihmisille (31) (32) (33), vaikka niiden on määritetty aiheuttavan ärsytystä kanitestissä. Koska RhE-mallit perustuvat ihmisestä saatuihin soluihin, niissä voidaan ennustaa, että kyseiset kemikaalit eivät ärsytä (YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen ”ei luokitusta”).

Taulukko 2

Samanlaisen tai mukautetun menetelmän validoimiseksi vaaditut herkkyyden, spesifisyyden ja yleisen tarkkuuden ennustearvot

Herkkyys	Spesifisyys	Yleinen tarkkuus
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Tutkimuksen hyväksymisperusteet

13. On mahdollista, että yhteen tai useampaan testikemikaaliin liittyvässä yhdessä tai useammassa testissä ei täytetä testi- ja vertailukemikaaleihin sovellettavia testien hyväksymisperusteita tai että sitä/niitä ei voida hyväksyä muista syistä. Kullekin testikemikaalille voidaan puuttuvien tietojen täydentämiseksi tehdä enintään kaksi täydentävää testiä (”uudelleentestaus”). Tarkemmin sanottuna kullakin testikemikaalilla voidaan tehdä enintään kaksi täydentävää testiajoa, koska uudelleentestauksen yhteydessä myös positiiviset ja negatiiviset vertailukemikaalit on testattava samanaikaisesti.

14. Mahdollisesti vielä uudelleentestauksen jälkeenkin kaikilla vertailukemikaaleilla ei saada aikaan kunkin testattavan kemikaalin osalta vaadittuja vähintään kolmea hyväksyttyä ajoa kaikissa osallistuvissa laboratorioissa. Näin ollen tietomatriisi ei ole täydellinen. Tällaisessa tapauksessa kaikki seuraavat kolme vaatimusta olisi täytettävä, jotta tiedot katsotaan hyväksyttäviksi:

    1. Kaikille 20 vertailukemikaalille on tehty vähintään yksi täydellinen testiajo.

▼**M3**

2. Kussakin (vähintään kolme) osallistuvassa laboratoriossa vähintään 85 prosenttia testiajoista ovat täydellisiä (20 kemikaalia; yhdessä laboratoriossa sallitaan kolme hylättyä testiä).

3. Vähintään 90 prosenttia kaikista mahdollisista vähintään kolmen laboratorion testiajoista ovat täydellisiä (20 kemikaalia, testattu kolmessa laboratoriossa; yhteensä kuusi hylättyä testiajoa sallitaan).

▼M2

B. 47. **NAUDAN SARVEISKALVON SAMEUTEEN JA LÄPÄISEVYYTEEN PERUSTUVA TESTIMENETELMÄ SILMÄÄ SYÖVYTTÄVIEN JA SILMÄÄ VAKAVASTI ÄRSYTTÄVIEN AINEIDEN TUNNISTAMISEKSI**

JOHDANTO

1. Naudan sarveiskalvon sameuteen ja läpäisevyyteen perustuva testimenetelmä (Bovine Corneal Opacity and Permeability, BCOP) on *in vitro* -testimenetelmä, jota voidaan tietyissä olosuhteissa ja tietyin rajoituksin käyttää aineiden ja seosten luokittelemiseksi silmää syövyttäviksi ja silmää vakavasti ärsyttäviksi (1) (2) (3). Tätä testimenetelmää sovellettaessa määritellään vakavasti ärsyttävät aineet sellaisiksi, jotka aiheuttavat silmävaurioita, jotka kestävät kanissa vähintään 21 vuorokautta annostelun jälkeen. Vaikka BCOP-testin ei katsota täysin korvaavan *in vivo* -kaninsilmätestiä, sen käyttöä suositellaan vaiheittaisessa testauksessa sääntömääräistä luokitusta ja merkintöjen määräämistä varten tietyllä sovellusalalla (4) (5). Testiaineet ja seokset (6) voidaan luokitella silmää syövyttäviksi tai silmää vakavasti ärsyttäviksi ilman kaneilla tehtävää lisätestausta. Aine, jolle saadaan testissä negatiivinen tulos, olisi testattava kaneissa käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa, kuten OECD:n ohjeessa Test Guideline 405 (7) (tämän liitteen B. 5 luku) esitetään.

2. Tässä testimenetelmässä kuvataan menettelyt, joilla arvioidaan testiaineen mahdollinen kyky syövyttää tai ärsyttää vakavasti silmää mittaamalla kykyä aiheuttaa sameutta ja läpäisevyyden lisääntymistä eristetyssä naudan sarveiskalvossa. Myrkylliset vaikutukset sarveiskalvoon mitataan seuraavilla menetelmillä: i) valon läpikulun (transmission) vähentyminen (sameus) ja ii) natriumfluoreseiini-väriaineen lisääntynyt siirtyminen silmään (läpäisevyys). Testiaineelle altistuksen jälkeen tehhtyjä sarveiskalvon sameus- ja läpäisevyysarviointeja tarkastellaan yhdessä siten, että voidaan johtaa *in vitro* -ärsyttävyysarvo (*In Vitro* Irritancy Score, IVIS), jonka avulla luokitellaan testiaineen ärsyttävyystaso.

3. BCOP-menetelmällä on testattu myös silmää ärsyttäviä aineita, jotka aiheuttavat alle 21 päivässä palautuvia vaurioita ja aineita, jotka eivät ärsytä silmää. BCOP-menetelmän tarkkuutta ja luotettavuutta näihin kategorioihin kuuluvien aineiden testauksessa ei ole kuitenkaan validoitu virallisesti.

4. Määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVIA HUOMIOITA JA RAJOITUKSIA

5. Tämä testimenetelmä perustuu ICCVAMin (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinointikomitea) BCOP-testimenetelmäprotokollaan (8), joka kehitettiin kansainvälisen validointitutkimuksen perusteella (4)(5)(9). Siihen ovat osallistuneet vaihtoehtoisten menetelmien eurooppalainen validointikeskus ECVAM ja Japanin vastaava keskus (JaCVAM). Protokolla perustuu tietoihin, jotka on saatu In vitro -tieteiden instituutista (IIVS) ja INVITTOX-protokollasta 124 (10), joka edustaa protokollaa, jota käytettiin Euroopan yhteisön tukemassa vuosina 1997–1998 tehdyssä BCOP-testin esivalidointitutkimuksessa. Molemmat protokollat perustuvat BCOP-määritysmenetelmään, jonka raportoivat ensimmäisenä Gautheron *et al.* (11).

▼M2

6. Tämän testimenetelmän haittoja ovat validointitietokannassa havaitut alkoholeille ja ketoneille saatujen väärien positiivisten tulosten suuri määrä ja kiinteille aineille saatujen väärien negatiivisten tulosten suuri määrä (ks. kohta 44) (5). Kun tietokannasta poistetaan näihin kemiallisiin ja fysikaalisiin luokkiin kuuluvat aineet, parantuu BCOP-menetelmän tarkkuus EU:n, EPAn ja GHS:n luokitusjärjestelmissä huomattavasti (5). Koska tämän testin tarkoituksena on ainoastaan tunnistaa silmiä syövyttävät ja/tai silmiä vakavasti ärsyttävät aineet, väärät negatiiviset tulokset eivät haittaa, koska tällaiset aineet testattaisiin myöhemmin kaneilla tai muilla asianmukaisesti validoiduilla *in vitro* -testeillä sääntömääräisistä vaatimuksista riippuen käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa ja todistusnäytön arviointia. Nykyisen validointitietokannan avulla ei myöskään voida arvioida asianmukaisesti tiettyjä kemikaali- tai tuoteluokkia (esimerkiksi seoksia). Tutkijat voisivat kuitenkin harkita tätä testimenetelmää kaikentyyppisille testimateriaaleille, myös seoksille, jolloin positiivisen tuloksen voitaisiin katsoa viittaavan silmän syövytykseen tai vakavaan ärsytykseen. Alkoholeilla ja ketoneilla saatuihin positiivisiin tuloksiin olisi kuitenkin suhtauduttava varovaisesti.

7. Kaikissa naudan silmiä ja sarveiskalvoja käyttävissä menettelyissä olisi noudatettava testauslaitoksen määräämiä eläinperäisten materiaalien (muun muassa muttei ainoastaan kudosten ja kudosnesteiden) käsittelyä koskevia sääntöjä. Suositellaan yleismaailmallisia laboratorioissa noudatettavia ennaltavarautumiskäytänteitä (12).

8. Eräs tämän testimenetelmän rajoitus on se, että vaikka siinä otetaan huomioon joitakin kanin silmä-ärsytystestissä arvioituja silmävaikutuksia ja jossain määrin niiden vakavuus, siinä ei tarkastella sidekalvon ja värikalvon vaurioita. Kaninsilmätutkimusten perusteella on myös ehdotettu, että vaikka BCOP-testissä ei sinänsä voida arvioida sarveiskalvovaurioiden palautuvuutta, voidaan kuitenkin arvioida sarveiskalvovaurion alkusyvyys ja sen avulla erottaa palautuvat ja palautumattomat vaikutukset (13). BCOP-menetelmällä ei voida myöskään arvioida sitä, missä määrin silmäaltistukseen voi liittyä systeemistä myrkyllisyyttä.

9. Tutkimuksissa pyritään selvittämään lisää BCOP-määrityksen käyttökelpoisuutta ja rajoituksia ei-vakavien ärsyttävien aineiden ja ei-ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi (ks. myös kohta 45). Käyttäjiä rohkaistaan antamaan näytteitä ja/tai tuloksia validointijärjestöille, jotta BCOP-testimenetelmän mahdollisia tulevia käyttötapoja, kuten ei-vakavien ärsyttävien aineiden ja ei-ärsyttävien aineiden tunnistusta, voidaan arvioida virallisesti.

10. Kun laboratorio alkaa käyttää tätä määritysmenetelmää, sen olisi käytettävä lisäyksessä 2 mainittuja pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja. Laboratorio voi käyttää näitä kemikaaleja osoittaakseen teknisen pätevyytensä BCOP-testin suorituksessa ennen kuin se toimittaa BCOP-määritystuloksia sääntömääräistä vaaraluokitusta varten.

TESTIN PERIAATE

11. BCOP-testimenetelmä on elinmalli, joka mahdollistaa naudan sarveiskalvon tavanomaisten fysiologisten ja biokemiallisten toimintojen lyhytaikaisen ylläpitämisen *in vitro* -oloissa. Testiaineen aiheuttamaa vauriota arvioidaan tässä menetelmässä mittaamalla muutokset sarveiskalvon sameudessa ns. opasitometrillä ja muutokset läpäisevyydessä näkyvää valoa mittaavalla spektrofotometrillä. Molempia mittauksia käytetään IVIS-arvon laskemiseen. IVIS-arvon avulla osoitetaan aineelle *in vitro* -ärsyttävyyteen perustuva vaaraluokituskategoria, jotta voidaan ennustaa testiaineen *in vivo* -silmä-ärsytyskyky (ks. päätöskriteerit).

▼M2

12. BCOP-testimenetelmässä käytetään vasta teurastetuista naudoista saaduista silmistä eristettyjä sarveiskalvoja. Sarveiskalvon sameus mitataan sinä valomääränä, joka kulkee sarveiskalvon läpi. Läpäisevyys mitataan sinä määränä natriumfluoreseiini-väriainetta, joka imeytyy koko sarveiskalvon läpi ja joka mitataan takakammiossa olevassa mediumissa (väliaineessa). Testiaineet annostellaan sarveiskalvon epiteelipinnalle lisäämällä sitä sarveiskalvotelineen etukammioon. Lisäyksessä 3 on kuvaus ja kaavio BCOP-testissä käytetystä sarveiskalvotelineestä. Sarveiskalvotelineitä saa kaupallisesti eri lähteistä, tai ne voi rakentaa itse.

Naudan silmien lähde ja eläinten ikä sekä eläinlajin valinta

13. Teurastamoihin tuodut nautaeläimet teurastetaan useimmiten käytettäväksi ihmisravinnoksi tai muihin kaupallisiin tarkoituksiin. BCOP-testiin voidaan käyttää vain sarveiskalvoja, jotka on saatu terveistä, ihmisravinnoksi kelpaavista eläimistä. Koska nautaeläinten paino vaihtelee paljon riippuen rodusta, iästä ja sukupuolesta, ei anneta mitään suositusta siitä, minkä painoisia eläinten olisi oltava teurastushetkellä.

14. Sarveiskalvojen mitat voivat vaihdella käytettäessä eri ikäisistä eläimistä saatuja silmiä. Yli kahdeksan vuoden ikäisistä eläimistä saatujen sarveiskalvojen halkaisija vaakasuunnassa on yleensä > 30,5 mm ja sarveiskalvon keskiosan paksuus (CCT) ≥ 1 100 μm, kun taas alle viiden vuoden ikäisten sarveiskalvon halkaisija on < 28,5 mm ja CCT < 900 μm. Tästä syystä ei yleensä käytetä silmiä, jotka on saatu yli 60 kuukauden ikäisistä eläimistä. Perinteisesti ei ole käytetty alle 12 kuukauden ikäisten nautojen silmiä, koska silmien kehitys on vielä kesken ja sarveiskalvo on huomattavasti ohuempi ja sen halkaisija pienempi kuin täysikasvuisten eläinten sarveiskalvon. Nuorista eläimistä (eli 6–12 kuukautta vanhoista) saatuja sarveiskalvoja voidaan käyttää, koska siihen liittyy joitakin etuja. Niitä saa helpommin, ikävaihtelu on pienempi, ja vaara työntekijöiden altistumisesta naudan spongiformiselle enkefalopatialle on pienempi (15). Koska olisi hyödyllistä arvioida lisää sarveiskalvon koon tai paksuuden vaikutusta sarveiskalvon reagoimiseen syövyttäviin ja ärsyttäviin aineisiin, käyttäjiä kehotetaan raportoimaan niiden eläinten arvioitu ikä ja/tai paino, joista tutkimuksessa käytetyt sarveiskalvot on saatu.

Silmien kerääminen ja niiden kuljetus laboratorioon

15. Teurastamon henkilökunta kerää silmät. Jotta silmille aiheutuisi mahdollisimman vähän mekaanista tai muuta vahinkoa, olisi silmämuna poistettava mahdollisimman pian kuoleman jälkeen. Jotta silmät eivät altistuisi mahdollisesti ärsyttäville aineille, teurastamon työntekijät eivät saisi käyttää detergenttejä huuhtoessaan eläimen päätä.

16. Silmät olisi upotettava kokonaan Hanksin suolaliuokseen (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) sopivankokoisessa astiassa ja kuljetettava laboratorioon sellaisella tavalla, että bakteerikontaminaatio tai muut vauriot ovat mahdollisimman pieniä. Koska silmät kerätään teurastuksen yhteydessä, niihin saattaa roiskua verta ja muita biologisia aineita, kuten bakteereja ja muita pieneliöitä. Siksi on tärkeää varmistaa, että kontaminaatioriski on mahdollisimman pieni. Esimerkiksi astia, jossa silmät ovat, on pidettävä jäähauteessa, ja kuljetusta varten käytettävään HBSS:ään on lisättävä antibiootteja (esim. penisilliiniä 100 IU/ml ja streptomysiiniä 100 μg/mL]).

▼M2

17. Silmien keräämisen ja BCOP-testin tekemisen välisen ajan pitäisi olla mahdollisimman lyhyt (keräys ja käyttö mieluiten samana päivänä), ja pitäisi osoittaa, etteivät määritystulokset ole sen takia epäluotettavia. Nämä tulokset perustuvat silmien valintaperusteisiin sekä positiivisten ja negatiivisten kontrollinäytteiden vasteisiin. Kaikkien määrityksessä käytettyjen silmien olisi oltava peräisin samasta tiettynä päivänä kerätystä silmäryhmästä.

BCOP-testissä käytettävien silmien valintaperusteet

18. Heti kun silmät saapuvat laboratorioon, tutkitaan huolellisesti, onko niissä vikoja, kuten lisääntynyttä sameutta, naarmuja ja verisuonittumista. Testissä saa käyttää vain sellaisista silmistä saatuja sarveiskalvoja, joissa ei ole tällaisia vikoja.

19. Kaikkien sarveiskalvojen laatua arvioidaan myös määrityksen myöhemmissä vaiheissa. Sarveiskalvot, joiden sameusaste yhden tunnin tasapainottumisajan jälkeen on suurempi kuin seitsemän sameusyksikköä (HUOM. opasitometri pitäisi kalibroida sameusyksikköjen vahvistamiseen käytetyillä sameusstandardeilla, ks. lisäys 3), hylätään.

20. Kussakin käsittelyryhmässä (testiaine, samaan aikaan tehtävät negatiiviset ja positiiviset kontrollit) on oltava vähintään kolme silmää. BCOP-määrityksessä pitäisi negatiiviseen kontrolliin käyttää kolme sarveiskalvoa. Koska kaikki sarveiskalvot leikataan kokonaisesta silmämunasta ja asetetaan sarveiskalvokammioihin, voi käsittelystä aiheutua vahinkoa, joka vaikuttaa yksittäisen sarveiskalvon sameuteen ja läpäisevyyteen (myös negatiivisessa kontrollissa). Negatiivisista kontrollisarveiskalvoista saatuja sameus- ja läpäisevyysarvoja käytetään lisäksi IVIS-laskelmissa korjaamaan testituotteella ja positiivisella kontrollilla käsiteltyjen sarveiskalvojen sameus- ja läpäisevyysarvoja.

MENETTELY

Silmien valmistelu

21. Virheettömät sarveiskalvot leikataan siten, että niihin jää 2–3 mm:n reuna kovakalvoa, mikä helpottaa myöhempää käsittelyä. Varotaan vahingoittamasta sarveiskalvon epiteeliä ja endoteeliä. Eristetyt sarveiskalvot asetetaan erikoistelineisiin, joissa on etu- ja takaosasto. Nämä ovat kosketuksissa sarveiskalvon epiteelipuoleen (etukammio) ja endoteelipuoleen (takakammio). Molemmat kammiot täytetään ylimäärin esilämmitetyllä Eaglen Minimum Essential Medium (EMEM) -viljelynesteellä (mediumilla) (takakammio ensin) ja varmistetaan, ettei muodostu kuplia. Laitteen annetaan tasapainottua 32 ± 1 celsiusasteessa vähintään tunnin, jotta sarveiskalvot tasapainottuvat mediumin kanssa ja niiden metabolinen toiminta palautuu normaaliksi (mikäli mahdollista). Sarveiskalvon pinnan lämpötila *in vivo* on noin 32°C.

22. Tasapainottumisjakson jälkeen molempiin kammioihin lisätään tuoretta esilämmitettyä EMEM:iä, ja kustakin sarveiskalvosta otetaan sameuden perustasolukema. Kaikki sarveiskalvot, joissa esiintyy makroskooppisia kudosvaurioita (esimerkiksi naarmuja, värihäiriöitä, verisuonittumista) tai joiden sameus ylittää 7 sameusyksikköä, hylätään. Kaikille tasapainotetuille sarveiskalvoille lasketaan sameuden keskiarvo. Negatiivisiksi kontrollisarveiskalvoiksi (liuotinkontrolli) valitaan vähintään kolme sarveiskalvoa, joiden sameusarvot ovat lähellä kaikkien sarveiskalvojen mediaania. Muut sarveiskalvot jaetaan käsittelyryhmään ja positiivisen kontrollin ryhmään.

▼M2

23. Koska veden lämpökapasiteetti on suurempi kuin ilman, vedellä saadaan tasaisempi inkubaatiolämpötila. Siksi suositellaan vesihauteen käyttöä sarveiskalvotelineen ja sen sisällön pitämiseksi 32 ± 1 celsiusasteessa. Kuitenkin myös ilmainkubaattoreita voidaan käyttää, kunhan huolehditaan siihen, että lämpötila pysyy vakaana (esimerkiksi esilämmittämällä telineet ja mediumit).

Testiaineen annostelu

24. Käsittelyä varten on kaksi eri protokollaa, toinen nesteille ja pinta-aktiivisille aineille (kiinteät tai nestemäiset) ja toinen kiinteille aineille, jotka eivät ole pinta-aktiivisia.

25. Nesteet testataan laimentamattomina. Pinta-aktiiviset aineet testataan 10-prosenttisen liuoksena (w/v) 0,9-prosenttisessa natriumkloridiliuoksessa, tislatussa vedessä tai muussa liuottimessa, josta on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää. Puoliksi kiinteät aineet, voiteet ja vahat testataan tavallisesti kuten nesteet. Jos laimennuksia muutetaan, on ne perusteltava. Sarveiskalvot altistetaan nesteille ja pinta-aktiivisille aineille 10 minuutin ajan. Jos altistusaikaa muutetaan, olisi se perusteltava tieteellisesti.

26. Kiinteät aineet, jotka eivät ole pinta-aktiivisia, testataan tavallisesti 20-prosenttisena liuoksena tai suspensiona 0,9-prosenttisessa natriumkloridiliuoksessa, tislatussa vedessä tai muussa liuottimessa, josta on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää. Joissakin olosuhteissa ja asianmukaisesti tieteellisesti perusteltuna kiinteitä aineita voidaan testata myös sellaisenaan annostelemalla niitä suoraan sarveiskalvon pinnalle avoimen kammion menetelmässä (ks. kohta 29). Sarveiskalvot altistetaan kiinteille aineille neljän tunnin ajan. Kuten nesteiden ja pinta-aktiivisten aineiden tapauksessa, altistusajan muuttaminen on perusteltava tieteellisesti.

27. Käsittely voi olla erilaista riippuen testattavan aineen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista, esimerkiksi siitä, onko kyseessä kiinteä aine, neste, viskoosi tai ei-viskoosi neste. Tärkeintä on varmistaa, että testiaine peittää riittävästi epiteelin pinnan ja että se voidaan huuhtelemalla poistaa riittävästi. Suljetun kammion menetelmää käytetään tavallisesti testattaville nesteille, jotka vaihtelevat ei-viskoosista lievästi viskoosiin, kun taas avoimen kammion menetelmää käytetään tavallisesti puoliksi viskooseille ja viskooseille nesteille ja kiinteille aineille.

28. Suljetun kammion menetelmässä annostellaan etukammioon niin paljon testiainetta (750 µl), että se peittää sarveiskalvon epiteelipuolen. Annostelu tapahtuu kammion yläosassa olevien aukkojen kautta. Aukot suljetaan sitten tulpilla altistuksen ajaksi. On tärkeää varmistaa, että kukin sarveiskalvo altistetaan testiaineelle niin pitkäksi aikaa kuin on asianmukaista.

29. Avoimen kammion menetelmässä ikkunan lukitusrengas ja etukammion lasi-ikkuna poistetaan ennen käsittelyä. Kontrollia tai testiainetta (750 µl tai niin paljon, että testiaine peittää sarveiskalvon kokonaan) annostellaan suoraan sarveiskalvon epiteelipinnalle mikropipetillä. Jos testiainetta on vaikea pipetoida, se voidaan siirtää paineen avulla ns. positive displacement -pipetointilaitteeseen annostelun helpottamiseksi. Positive displacement -pipetin kärki työnnetään ruiskun annostelukärkeen niin, että aine voidaan siirtää displacement-pipetin kärkeen paineen avulla. Ruiskun mäntää painetaan samalla kun pipetin mäntää vedetään ylöspäin. Jos pipetin kärkeen ilmestyy ilmakuplia, testiaine puhalletaan ulos ja prosessi toistetaan, kunnes kärki saadaan täytettyä ilman ilmakuplia. Jos on tarpeen, voidaan käyttää tavallista ruiskua (ilman neulaa), koska sillä voidaan mitata tarkka tilavuus testiainetta, ja annostelu sarveiskalvon epiteelipinnalle on helpompaa. Annostelun jälkeen lasi-ikkuna pannaan paikalleen etukammion päälle, jotta järjestelmä on jälleen suljettu.

▼M2

Inkubointi altistuksen jälkeen

30. Altistusajan jälkeen testiaine, negatiivinen kontrolliaine tai positiivinen kontrolliaine poistetaan etukammiosta ja epiteeli pestään vähintään kolmesti (tai kunnes testiainetta ei näy) EMEM:illä (jossa on fenolipunaa). Huuhteluun käytetään fenolipunaa sisältävää mediumia, koska fenolipunan värin vaihtumista voidaan seurata, kun halutaan määrittää happamien tai emäksisten aineiden huuhtelun tehokkuus. Sarveiskalvoja pestään enemmän kuin kolme kertaa, jos fenolipuna on edelleen vääränvärinen (keltainen tai purppuranvärinen) tai jos testiainetta on vielä näkyvillä. Kun mediumissa ei ole enää testiainetta, sarveiskalvot pestään vielä kerran EMEM:illä (jossa ei ole fenolipunaa). EMEM-huuhtelua (ilman fenolipunaa) käytetään viimeiseksi sen varmistamiseksi, että fenolipuna on poistunut etukammiosta ennen sameusmittausta. Etukammio täytetään sitten uudelleen tuoreella EMEM:illä (ilman fenolipunaa).

31. Kun testiaine on neste tai pinta-aktiivinen aine, sarveiskalvoja inkuboidaan huuhtelun jälkeen vielä kaksi tuntia 32 ± 1 celsiusasteessa. Tietyissä olosuhteissa voi pitempi aika altistuksen jälkeen olla hyödyksi. Sitä voidaan harkita tapauskohtaisesti. Kiinteillä aineilla käsitellyt sarveiskalvot huuhdellaan perusteellisesti neljän tunnin altistuksen päätteeksi, mutta niitä ei tarvitse enää inkuboida enempää.

32. Kunkin sarveiskalvon sameus ja läpäisevyys kirjataan nesteille ja pinta-aktiivisille aineille altistuksen jälkeisen inkubaation jälkeen ja kiinteille aineille, jotka eivät ole pinta-aktiivisia aineita, neljän tunnin altistuksen jälkeen. Kutakin sarveiskalvoa tarkastellaan myös silmämääräisesti ja kirjataan merkitykselliset havainnot (esimerkiksi kudoksen kuoriutuminen, testiaineen jäämät, epätasainen sameusjakauma). Tällaiset havainnot voivat olla tärkeitä, sillä ne voivat näkyä opasitometrin lukemien vaihteluna.

Kontrolliaineet

33. Kussakin kokeessa on mukana samanaikaisesti määritettävät negatiiviset eli liuotin/vehikkelikontrollit ja positiiviset kontrollit.

34. Kun testataan 100-prosenttista nestemäistä ainetta, otetaan BCOP-määritykseen samanaikaisesti määritettävä negatiivinen kontrolli (esimerkiksi 0,9-prosenttinen natriumkloridiliuos tai tislattu vesi) sitä varten, että epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä voidaan havaita ja määrityksen päätepisteille saadaan perustaso. Näin varmistetaan myös, etteivät määritysolosuhteet aiheuta ärsytysvastetta tahattomasti.

35. Kun testataan laimennettua nestettä, pinta-aktiivista ainetta tai kiinteää ainetta, otetaan BCOP-määritykseen samanaikaisesti määritettävä liuotin/vehikkelikontrolliryhmä sitä varten, että epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä voidaan havaita ja määrityksen päätepisteille saadaan perustaso. Liuotinta/vehikkeliä saa käyttää vain, jos on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää.

36. Kuhunkin kokeeseen otetaan mukaan tunnettu silmiä ärsyttävä aine positiivisena kontrollina, jotta voidaan varmistaa, että saadaan asianmukainen vaste. Koska BCOP-määritystä käytetään tässä testimenetelmässä syövyttävien tai vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi, positiivisen kontrollin olisi mielellään oltava aine, joka aiheuttaa vakavan vasteen tässä testimenetelmässä. Ärsytysvaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan määrittää.

37. Nestemäisille testiaineille voidaan positiivisena kontrollina käyttää esimerkiksi dimetyyliformamidia tai 1-prosenttista natriumhydroksidia. Kiinteiden testiaineiden positiivisena kontrollina voidaan käyttää esimerkiksi 20-prosenttista (w/v) imidatsolia 0,9-prosenttisessa natriumkloridiliuoksessa.

▼M2

38. Vertailuaineet ovat hyödyllisiä, kun arvioidaan tiettyyn kemikaali- tai tuoteryhmään kuuluvien tuntemattomien kemikaalien silmä-ärsytyskykyä tai silmää ärsyttävän aineen suhteellista ärsytyskykyä tietyllä ärsytysvastealueella.

Mitatut päätepisteet

39. Sarveiskalvon sameus mitataan sinä valomääränä, joka kulkee sarveiskalvon läpi. Sarveiskalvon sameus mitataan kvantitatiivisesti opasitometrillä, jolla saadaan jatkuvalla asteikolla mitattuja sameusarvoja.

40. Läpäisevyys mitataan sinä määränä natriumfluoreseiini-väriainetta, joka imeytyy kaikkien sarveiskalvon solukerrosten (ts. sarveiskalvon ulkopinnan epiteelin ja sisäpinnan endoteelin) läpi. 1 ml natriumfluoreseiiniliuosta (4 mg/ml testattaessa nesteitä tai pinta-aktiivisia aineita tai 5 mg/ml testattaessa kiinteitä aineita, jotka eivät ole pinta-aktiivisia) lisätään sarveiskalvotelineen etukammioon, joka on kosketuksissa sarveiskalvon epiteelipuolen kanssa. Takakammiossa, joka on kosketuksissa sarveiskalvon endoteelipuolen kanssa, on tuoretta EMEM:iä. Telinettä inkuboidaan vaakasuorassa 90 ± 5 min 32 ± 1 celsiusasteessa. Takakammioon siirtyvän natriumfluoreseiinin määrä mitataan UV/VIS-spektrofotometrillä. 490 nanometrin aallonpituudella mitatut spektrofotometrin lukemat kirjataan optisena tiheytenä (OD_{490}) tai absorbanssiarvoina, jotka mitataan jatkuvalla asteikolla. Fluoreseiiniläpäisevyysarvot määritetään käyttäen OD_{490} -arvoja, jotka on mitattu spektrofotometrillä tavanomaisella 1 senttimetrin valotiellä.

41. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää 96 kuopan kuoppalevyjen lukulaitetta, jos i) laitteen fluoreseiinin OD_{490} -arvojen mittausalue on lineaarinen; ja ii) 96 kuopan levyissä käytetään sellaista fluoreseiininäytteiden tilavuutta, jolla saadaan 1 cm:n valotiellä saatuja arvoja vastaavat OD_{490} -arvot (tämä saattaa edellyttää, että kuoppa täytetään kokonaan [tavallisesti 360ml]).

MITTAUSTULOKSET JA TESTISELOSTEET

Mittaustulosten arviointi

42. Kun sameusarvot ja keskimääräiset läpäisevyysarvot (OD_{490}) on korjattu taustan sameuden ja negatiivisen kontrollin läpäisevyyden OD_{490} -arvojen suhteen, yhdistetään kunkin käsittelyryhmän sameuden keskiarvot ja läpäisevyyden keskimääräiset OD_{490} -arvot kokemusperäiseen kaavaan, josta lasketaan kullekin käsittelyryhmälle *in vitro* -ärsytysaste (IVIS) seuraavasti:

IVIS = sameuden keskiarvo + (15 × keskimääräinen läpäisevyyden OD_{490} -arvo)

Sina *et al*. (16) ovat raportoineet, että tämä kaava on johdettu heidän laboratoriossaan ja laboratorioidenvälisissä tutkimuksissa. Monilaboratoriotutkimuksessa 36 yhdisteen sarjalle saaduille tuloksille tehtiin monimuuttuja-analyysi, jossa määritettiin paras yhtälö *in vivo* ja *in vitro* saatujen tuloksien välille. Kahden yhtiön tutkijat tekivät tämän analyysin. He johtivat lähes identtiset yhtälöt.

43. Sameus- ja läpäisevyysarvoja olisi arvioitava myös erikseen, jotta nähdään, aiheuttaako testiaine syövytystä tai vakavaa ärsytystä vain yhden päätepisteen määrityksessä (ks. päätöskriteerit).

▼M2

Päätöskriteerit

44. Aine, jonka aiheuttama IVIS on vähintään 55.1, määritellään syövyttäväksi tai vakavaa ärsytystä aiheuttavaksi aineeksi. Kuten 1 kohdassa mainittiin, jos testiainetta ei tunnisteta silmiä syövyttäväksi tai niitä vakavasti ärsyttäväksi, on testausta jatkettava luokitusta ja merkintöjen määräämistä varten. BCOP-testimenetelmän yleinen tarkkuus on välillä 79 % (113/143) – 81 % (119/147), siinä saatujen väärien positiivisten tulosten määrä on välillä 19 % (20/103) – 21 % (22/103) ja väärien negatiivisten tulosten määrä välillä 16 % (7/43) – 25 % (10/40) verrattuna kanin silmää *in vivo* käyttävällä testimenetelmällä saatuihin tuloksiin luokiteltuna EPAn (1), EU:n (2) tai GHS:n (3) luokitusjärjestelmien mukaan. Kun tietokannasta jätetään pois tiettyihin kemiallisiin (alkoholit, ketonit) tai fysikaalisiin (kiinteät aineet) luokkiin kuuluvat aineet, BCOP-menetelmän tarkkuus EPAn, EU:n ja GHS:n luokitusjärjestelmissä vaihtelee väillä 87 % (72/83) – 92 % (78/85), väärien positiivisten tulosten määrä on välillä 12 % (7/58) – 16 % (9/56) ja väärien negatiivisten tulosten määrä välillä 0 % (0/27) – 12 % (3/26).

45. Vaikka testiaineelle ei saataisi luokitusta silmiä syövyttäväksi tai niitä vakavasti ärsyttäväksi aineeksi, BCOP-menetelmässä saaduista tuloksista voi olla hyötyä käytettynä yhdessä *in vivo* -kaninsilmätestissä tai asianmukaisesti validoidussa *in vitro* -testissä saatujen testitulosten kanssa, kun arvioidaan BCOP-menetelmän käyttökelpoisuutta ja rajoituksia muiden kuin vakavasti ärsyttävien ja ei-ärsyttävien aineiden tunnistamisessa (valmisteilla on ohjeet *in vitro* -silmämyrkyllisyystestimenetelmien käytöstä).

Tutkimuksen hyväksymiskriteerit

46. Testiä pidetään hyväksyttävänä, jos positiivisella kontrollilla saadaan IVIS-arvo, joka on kahden standardipoikkeaman sisällä senhetkisestä pitkän aikavälin keskiarvosta, joka on päivitettävä vähintään kolmen kuukauden välein tai joka kerta kun sellaisissa laboratorioissa, joissa testejä tehdään vain harvoin (vähemmän kuin kerran kuussa) saadaan hyväksytty testi. Negatiivisista tai liuotin/vehikkelivasteista saatujen sameus- ja läpäisevyysarvojen pitäisi olla pienemmät kuin vahvistetut sameuden ja läpäisevyyden taustaraja-arvot naudan sarveiskalvolle, jota on käsitelty negatiivisilla tai liuotin/vehikkelikontrolleilla.

Testiseloste

47. Testiselosteessa olisi annettava seuraavat tiedot, jos ne ovat merkityksellisiä tutkimuksen suorittamiselle:

Testi- ja kontrolliaineet

Kemiallinen nimi (nimet), kuten CAS:n (Chemical Abstracts Service) käyttämä rakennetta kuvaava nimi, jonka jälkeen annetaan muut nimet, jos ne tunnetaan;

CAS-numero, jos se tunnetaan;

Aineen tai seoksen puhtausaste tai koostumus (painoprosentteina), jos tieto on saatavilla;

Testin suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet, kuten olomuoto, haihtuvuus, pH, stabiilius, kemiallinen luokka ja vesiliukoisuus;

Tarvittaessa testi- ja/tai kontrolliaineiden käsittely ennen testiä (esim. lämmittäminen tai jauhaminen);

Stabiilius, jos se tiedetään.

▼M2

Sponsoria ja testauslaitosta koskevat tiedot:

Sponsorin nimi ja osoite, testilaitos ja tutkimusjohtaja;

Silmien lähde (laitos, josta ne on kerätty);

Silmien säilytys- ja kuljetusolosuhteet (kuten silmien keräyspäivä ja kellonaika, aika siihen asti kun testi aloitettiin, kuljetuksessa käytetty medium ja lämpötilaolot, mahdollisesti käytetyt antibiootit);

Erityistietoja eläimistä, joista silmät on kerätty (kuten ikä, sukupuoli, paino), jos tiedot ovat saatavilla.

Käytetyn testimenetelmän ja protokollan perustelu

Testimenetelmän integriteetti

Menettely, jolla testimenetelmän integriteetti (ts. tarkkuus ja luotettavuus) ajan suhteen varmistetaan (esimerkiksi pätevöittämiseen käytettyjen aineiden säännöllinen testaus, aiempien negatiivisten ja positiivisten kontrollitulosten käyttö).

Hyväksyttävän testin kriteerit

Hyväksyttävät aiempiin tuloksiin perustuvat samaan aikaan tehtyjen positiivisten ja negatiivisten kontrollien vaihteluvälit;

Tapauksen mukaan hyväksyttävät aiempiin tuloksiin perustuvat samaan aikaan tehtyjen vertailukontrollien vaihteluvälit.

Testausolosuhteet

Kuvaus käytetystä testijärjestelmästä;

Käytetyn sarveiskalvotelineen tyyppi;

Kalibrointitiedot laitteista, joita käytettiin sameuden ja läpäisevyyden mittaukseen (esimerkiksi opasitometri ja spektrofotometri);

Käytettyjä naudan silmiä koskevat tiedot, myös niiden laatua koskeva lausuma:

Käytetty testimenettely yksityiskohtaisesti;

Käytetyt testiainekonsentraatiot;

Kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista;

Viittaus mallia koskeviin aiempiin tuloksiin (esimerkiksi negatiiviset ja positiiviset kontrollit, pätevöittämiseen käytetyt aineet, vertailuaineet);

Kuvaus käytetyistä arviointikriteereistä.

Tulokset

Esitetään taulukossa tulokset, jotka on saatu yksittäisistä testinäytteistä (esimerkiksi sameus ja OD_{490} -arvot ja lasketut IVIS-arvot testiaineelle sekä positiivisille, negatiivisille ja vertailukontrolleille [jos mukana] taulukkomuodossa, myös tulokset toistetuista kaksoismäärityksistä tapauksen mukaan, sekä keskiarvot ± standardipoikkeamat kullekin kokeelle;

Kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

Tulosten tarkastelu

Päätelmä

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼M2

(2) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta. EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

(3) YK (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneve: United Nations Publications, 2007. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(6) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006, annettu 18 päivänä joulukuuta 2006, kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta. EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,
en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/-
ocu_brd_ice.htm]

(10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italia: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

▼**M2**

(11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

(13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

(17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuudella mitataan testimenetelmän suoritusta, ja se on eräs ”relevanssin” näkökohta. Termiä käytetään usein ”konkordanssin” kanssa vaihtoehtoisena, jolloin sillä tarkoitetaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta.

Vertailuaine: Aine, johon testiainetta verrataan. Vertailuaineella olisi oltava seuraavat ominaisuudet: i) se saadaan vakaana pysyvästä ja luotettavasta lähteestä; ii) sen rakenne ja toiminta ovat samankaltaisia testattavan aineryhmän kanssa; iii) sen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tunnetaan; iv) se tukee tunnetuista vaikutuksista saatuja tietoja, ja v) sen vaikutuskyky halutun vasteen vaihtelualueella tunnetaan.

Sarveiskalvo: Silmämunan etuosan läpinäkyvä osa, joka peittää värikalvon ja silmäterän ja päästää valoa sisäosiin.

Sarveiskalvon sameus: Sarveiskalvon sameuden mitta, kun sarveiskalvo on altistettu testiaineelle. Sarveiskalvon sameuden lisääntyminen merkitsee sarveiskalvon vauriota. Sameus voidaan arvioida subjektiivisesti Draizen kaninsilmätestillä tai objektiivisesti jollain laitteella, kuten ”opasitometrillä”.

Sarveiskalvon läpäisevyys: Sarveiskalvon epiteelin vaurion mitta, jota varten määritetään kaikkien sarveiskalvon solukerrosten läpi menneen fluoreseiini-väriaineen määrä.

EPA-kategoria 1: Syövyttävä (palautumaton silmäkudoksen tuhoutuminen) tai yli 21 vuorokautta kestävä sarveiskalvoon kohdistuva vaikutus tai ärsytys (1).

EU:n R41-luokka: Silmän kudosvauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta (2).

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Niiden positiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Väärien positiivisten tulosten osuus on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattori.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Kaikkien negatiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Väärien positiivisten tulosten osuus on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattori.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Järjestelmä, jossa ehdotetaan kemikaalien (aineet ja seokset) luokitusta fysikaalisten, terveyteen ja ympäristöön liittyvien vaarojen standardityyppien ja -tasojen mukaisesti ja osoitetaan niille vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien kielteisistä vaikutuksista ihmisten (mukaan luettuina työnantajat, työntekijät, kuljettajat, kuluttajat ja pelastushenkilöstö) ja ympäristön suojelemiseksi (3).

▼M2

GHS-kategoria 1: Silmän kudosvauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta (3).

Vaara: Vaikuttavan tekijän (”agentin”) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

***In vitro* ärsytysarvo (*In Vitro* Irritancy Score, IVIS):** BCOP-testissä käytetty empiirisesti johdettu kaava, jossa kunkin käsittelyryhmän sameuden keskiarvot ja läpäisevyyden keskiarvot yhdistetään yhteen *in vitro* -arvoon. IVIS = sameuden keskiarvo + (15 x keskimääräinen läpäisevyysarvo)

Negatiivinen kontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat. Negatiivinen kontrolli prosessoidaan testiaineella käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, reagoiko liuotin testijärjestelmän kanssa.

Ei-ärsyttävä: Aineet, joita ei ole luokiteltu EPA-järjestelmän kategoriaan I, II tai III; EU:n kategoriaan R41 tai R36; tai GHS:n kategoriaan 1, 2A tai 2B silmää ärsyttäväksi aineeksi.

Silmää syövyttävä aine: a) Aine, joka aiheuttaa silmään palautumatonta kudosvauriota; b) aineet, jotka on luokiteltu GHS:n kategoriaan 1, EPAn kategoriaan I tai EU:n kategoriaan R41 silmää ärsyttäviksi aineiksi (1) (2) (3).

Silmää ärsyttävä aine: a) Aine, joka aiheuttaa silmään palautuvan muutoksen, kun sitä on annosteltu silmän etupinnalle; b) aineet, jotka on luokiteltu EPAn kategoriaan II tai III, EU:n kategoriaan R36 tai GHS:n kategoriaan 2A tai 2B silmää ärsyttäviksi aineiksi (1) (2) (3).

Silmää vakavasti ärsyttävä aine: a) Aine, joka aiheuttaa silmän etupinnalle annosteltuna kudosvauriota, joka ei korjaudu 21 päivän kuluessa annostelusta tai joka aiheuttaa näkökyvyn vakavaa fyysistä rappiota; b) aineet, jotka on luokiteltu GHS:n kategoriaan 1, EPAn kategoriaan I tai EU:n kategoriaan R41 silmää ärsyttäviksi aineiksi (1) (2) (3).

Opasitometri: Laite, jolla mitataan sarveiskalvon sameutta arvioimalla kvantitatiivisesti valon kulkeminen sarveiskalvon läpi. Opasitometrissä on tyypillisesti kaksi osastoa, joista kussakin on oma valonlähde ja valokenno. Toista osastoa käytetään käsitellylle sarveiskalvolle ja toista laitteen kalibrointiin ja nollaamiseen. Halogeenilampun valoa lähetetään kontrolliosaston läpi (tyhjä kammio, jossa ei ole ikkunaa eikä nestettä) valokennoon ja verrataan valoon, joka on lähetetty näytteelle käytetyn osaston (jossa on sarveiskalvon sisältävä kammio) läpi valokennoon. Valokennoista saadun valon transmissioita verrataan, ja numeronäytöllä näytetään numeerinen sameuden arvo.

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vakava vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

▼M2

Luotettavuus: Arvo, joka osoittaa, missä määrin testimenetelmä pystytään suorittamaan uusittavalla tavalla samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus.

Liuotin/vehikkelikontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, mukaan luettuina liuotin tai vehikkeli, ja joka prosessoidaan testiaineella käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testiaine on liuotettu samaan liuottimeen tai vehikkeliin. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti negatiivisen kontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai vehikkeli testijärjestelmän kanssa.

Vaiheittainen testaus: Vaiheittainen testausstrategia, jossa kaikkia testiainetta koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen todistusnäyttöprosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Jos testiaineen ärsytyskyky voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, ei lisätestausta tarvita. Jos testiaineen ärsytyskykyä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määritellä aukottomasti.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka validointitutkimukset on saatettu päätökseen ja relevanssi (tarkkuus mukaan luettuna) ja luotettavuus tiettyä tarkoitusta varten on määritetty. On tärkeää huomata, että validoitu testi ei ehkä ole riittävän tarkka ja luotettava, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen.

Todistusnäyttö: Prosessi, jossa tarkastellaan erilaisten tietojen vahvuuksia ja heikkouksia, kun niiden avulla on tarkoitus päättää aineen vaarallisuutta koskevasta päätelmästä tai kun tietojen on määrä tukea kyseistä päätelmää.

▼M2

Lisäys 2

Pätevöittämiseen käytettävät aineet BCOP-testimenetelmälle

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tähän testimenetelmään perustuvaa menetelmää rutiininomaisesti, se voi osoittaa teknisen pätevyytensä määrittämällä oikein taulukossa 1 suositeltujen 10 aineen syövyttävyysluokituksen. Aineet on valittu siten, että ne edustavat sellaisia paikallisen silmä-ärsytyksen ja/tai syövytyksen vasteita, jotka perustuvat *in vivo* kaninsilmätestissä (TG 405) saatuihin tuloksiin (ts. YK:n GHS-järjestelmän kategoriat 1, 2A, 2B tai ”Ei luokiteltu ja merkitty”) (3) (7). Kun otetaan huomioon näiden määritysten validoitu hyödyllisyys (ts. ainoastaan silmää syövyttävien ja/tai silmää vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamista varten), vain kahta luokitustarkoituksiin käytettävää testitulosta (syövyttävät ja/tai silmää vakavasti ärsyttävät aineet tai ei-syövyttävät ja/tai ei vakavasti ärsyttävät aineet) käytetään pätevyyden osoittamiseksi. Muita valintakriteerejä ovat se, että aineet ovat kaupallisesti saatavilla, että saatavilla on laadukkaita *in vivo* -vertailutietoja ja että on laadukkaita tietoja niistä kahdesta *in vitro* -menetelmästä, joille parhaillaan kehitetään testiohjeita. Tästä syystä ärsyttävät aineet silmätoksisuuden *in vitro* -testimenetelmien validointiin valittiin ICCVAM:n 122 suositellun vertailuaineen luettelosta (ks. lisäys H): ICCVAM: suositellut vertailuaineet (5). Vertailutiedot ovat saatavilla BCOP-menetelmälle ja eristetyllä kanan silmällä tehtävälle testimenetelmälle (ICE) laadituista tausta-asiakirjoista (17) (18).

Taulukko 1

Suositellut aineet BCOP-menetelmän teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Aine	CAS-nro	Kemiallinen luokka (1)	Fysikaalinen olomuoto:	*In vivo* -luokitus (2)	*In vitro* -luokitus (3)
Bentsalkoniumkloridi (5 %)	8001-54-5	Oniumyhdiste	Neste	Kategoria 1	Syövyttävä /vakavasti ärsyttävä
Klooriheksidiini	55-56-1	Amiini, amidiini	Kiinteä	Kategoria 1	Syövyttävä /vakavasti ärsyttävä
Dibentsoyyli-L-viinihappo	2743-38-6	Karboksyylihappo, esteri	Kiinteä	Kategoria 1	Syövyttävä /vakavasti ärsyttävä
Imidatsoli	288-32-4	Heterosyklinen	Kiinteä	Kategoria 1	Syövyttävä /vakavasti ärsyttävä
Trikloorietikkahappo (30 %)	76-03-9	Karboksyylihapot	Neste	Kategoria 1	Syövyttävä /vakavasti ärsyttävä
2,6-Diklooribentsoyylikloridi	4659-45-4	Asyylihalidi	Neste	Kategoria 2A	Ei syövyttävä /ei vakavasti ärsyttävä
Etyyli-2-metyyliasetoasetaatti	609-14-3	Ketoni, esteri	Neste	Kategoria 2B	Ei syövyttävä /ei vakavasti ärsyttävä
Ammoniumnitraatti	6484-52-2	Epäorgaaninen suola	Kiinteä	Kategoria 2A	Ei syövyttävä /ei vakavasti ärsyttävä

▼**M2**

Aine	CAS-nro	Kemiallinen luokka ([1])	Fysikaalinen olomuoto:	*In vivo* -luokitus ([2])	*In vitro* -luokitus ([3])
Glyseroli	56-81-5	Alkoholi	Neste	Ei merkintää	Ei syövyttävä /ei vakavasti ärsyttävä
n-Heksaani	110-54-3	Hiilivety (asyklinen)	Neste	Ei merkintää	Ei syövyttävä /ei vakavasti ärsyttävä

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

([1]) Kunkin testiaineen kemiallinen luokka määritettiin National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) -luokitusjärjestelmään (saatavilla osoitteessa http//www.nlm.nih.gov/mesh) perustuvan tavanomaisen luokitusjärjestelmän perusteella.

([2]) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu kanin silmällä tehdyllä *in vivo* -testillä (OECD TG 405) käyttäen YK:n GHS-järjestelmää (3)(7).

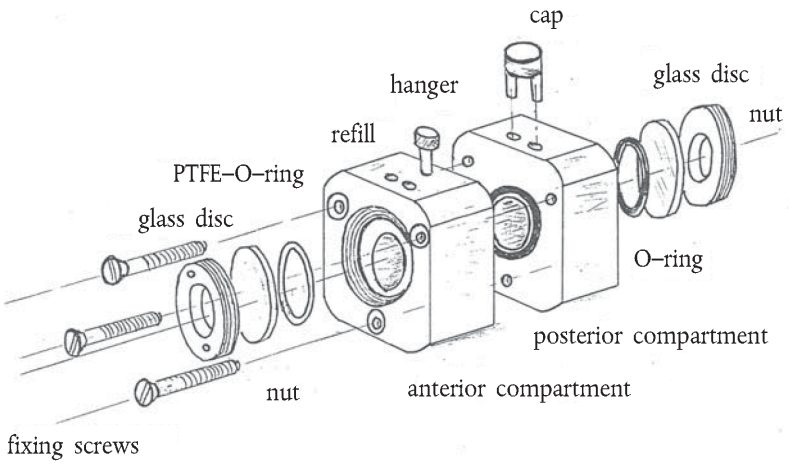
([3]) Perustuu BCOP- ja ICE-testien tuloksiin.

▼**M2**

Lisäys 3

BCOP-TESTISSÄ KÄYTETTY SARVEISKALVOTELINE

1. BCOP-testissä käytetyt sarveiskalvotelineet valmistetaan reagoimattomasta aineesta (esimerkiksi polypropyleenistä). Telineissä on kaksi puolta (etu- ja takakammio) ja kaksi samanlaista lieriönmuotoista sisäkammiota. Kuhunkin kammioon mahtuu 5 ml:aa, ja niiden päässä on lasi-ikkuna, jonka läpi sameusmittaukset tehdään. Kunkin sisäkammion halkaisija on 1,7 cm ja syvyys 2,2 cm ([1]) Takakammiossa on tiivisterengas vuotojen estämiseksi. Sarveiskalvo asetetaan endoteelipuoli alaspäin takakammion tiivisterenkaan päälle, ja etukammio asetetaan sarveiskalvon epiteelipuolen päälle. Kammiot kiinnitetään paikoilleen kolmella ruostumattomasta teräksestä valmistetulla ruuvilla, jotka sijaitsevat kammion ulkoreunoilla. Kunkin kammion päässä on lasi-ikkuna, joka voidaan poistaa, että sarveiskalvoon päästään helposti käsiksi. Lasi-ikkunan ja kammion välissä on tiivisterengas vuotojen estämiseksi. Medium ja testiyhdisteet lisätään kammioon (ja poistetaan siitä) niiden yläosassa olevien kahden aukon kautta. Aukot suljetaan kumitulpilla käsittelyn ja inkubaation ajaksi.



Sanasto

Glass disc: Lasikiekko

PTFE-O-ring: PTFE-tiivisterengas

Refill: Täyttö

Hanger: Ripustinlaite

Cap: Tulppa

Nut: Mutteri

O-ring: Tiivisterengas

Posterior compartment: Takaosasto

Anterior compartment: Etuosasto

Fixing screws: Kiinnitysruuvit

([1]) Mitat ovat sarveiskalvotelineelle, jota käytetään 12–60 kuukauden ikäisille lehmille. Jos käytetään 6–12 kuukauden ikäisiä eläimiä, olisi teline suunniteltava niin, että kunkin kammion tilavuus on 4 ml ja kunkin sisäkammion halkaisija 1,5 cm ja syvyys 2,2 cm. Jos tehdään uusi, erilainen sarveiskalvoteline, on tärkeää huolehtia siitä, että altistetun sarveiskalvon pinta-alan suhde takakammion tilavuuteen on sama kuin käytettäessä tavanomaista sarveiskalvotelinettä. Tämä on välttämätöntä, jotta läpäisevyysarvot voidaan määrittää oikein IVIS-arvon laskemiseksi ehdotetulla kaavalla.

▼**M2**

OPASITOMETRI

2. Opasitometri on laite, jolla mitataan valon transmissiota. Halogeenilampun valoa lähetetään kontrolliosaston läpi (tyhjä kammio, jossa ei ole ikkunaa eikä nestettä) valokennoon ja verrataan valoon, joka on lähetetty näytteelle käytetyn osaston (jossa on sarveiskalvon sisältävä kammio) läpi valokennoon. Valokennoista saadun valon transmissioita verrataan, ja numeronäytöllä näytetään numeerinen sameuden arvo. Sameusyksiköt määritetään.

3. Opasitometrillä pitäisi saada lineaarinen vaste sellaisella sameuslukema-alueella, joka kattaa ennustemallissa kuvatuille eri luokituksille käytetyt raja-arvot (ts. siihen arvoon saakka, joka määrittää syövyttävyyden ja/tai vakavan ärsyttävyyden). Jotta voidaan varmistaa, että lukemat ovat lineaarisia ja tarkkoja 75–80 sameusyksikköön saakka, on opasitometri kalibroitava sarjalla kalibraattoreita. Kalibraattorit (opaakit polyesterilevyt) asetetaan kalibrointikammioon (sarveiskalvokammio, joka on suunniteltu kalibraattoreiden käyttöä varten), ja opasitometristä otetaan lukemat. Kalibrointikammio on suunniteltu sellaiseksi, että kalibraattorit ovat siinä suunnilleen samalla etäisyydellä valosta ja valokennosta kuin mihin sarveiskalvot asetettaisiin sameusmittausten ajaksi. Opasitometri kalibroidaan ensin 0 sameusyksikköön käyttäen kalibrointikammiota, jossa ei ole kalibraattoria. Kalibrointikammioon asetetaan sitten peräkkäin kolme erilaista kalibraattoria ja mitataan sameudet. Kalibraattoreilla 1, 2 ja 3 pitäisi saada 5 prosentin tarkkuudella samat sameuslukemat kuin asetetut arvot 75, 150 ja 225 sameusyksikköä.

▼M2

B. 48. ERISTETTYÄ KANAN SILMÄÄ KÄYTTÄVÄ TESTIMENETELMÄ SILMÄÄ SYÖVYTTÄVIEN JA SILMÄÄ VAKAVASTI ÄRSYTTÄVIEN AINEIDEN TUNNISTAMISEKSI

JOHDANTO

1. Eristetyn kanan silmän käyttöön perustuva testimenetelmä (Isolated Chicken Eye, ICE) on *in vitro* -testimenetelmä, jota voidaan tietyissä olosuhteissa ja tietyin rajoituksin käyttää aineiden ja seosten luokittelemiseksi silmää syövyttäviksi ja silmää vakavasti ärsyttäviksi (1) (2) (3). Tätä testimenetelmää sovellettaessa määritellään vakavasti ärsyttävät aineet sellaisiksi, jotka aiheuttavat silmävaurioita, jotka kestävät kanissa vähintään 21 vuorokautta annostelun jälkeen. Vaikka ICE-testin ei katsota täysin korvaavan *in vivo* -kaninsilmätestiä, sen käyttöä suositellaan vaiheittaisessa testauksessa sääntömääräistä luokitusta ja merkintöjen määräämistä varten tietyllä sovellusalalla (4) (5). Testiaineita ja seoksia (6), jotka ovat tässä määrityksessä positiivisia, voidaan luokitella silmää syövyttäviksi tai silmää vakavasti ärsyttäviksi ilman kaneilla tehtävää lisätestausta. Aine, jolle saadaan testissä negatiivinen tulos, olisi testattava kaneissa käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa, kuten OECD:n ohjeessa Test Guideline 405 (7) (tämän liitteen B. 5 luku) esitetään.

2. Tässä testimenetelmässä kuvataan menettelyt, joilla arvioidaan testiaineen mahdollinen kyky syövyttää tai ärsyttää vakavasti silmää mittaamalla kykyä aiheuttaa myrkyllisyyttä eristetyssä kanan silmässä, josta silmämuna on poistettu. Sarveiskalvoon kohdistuneet myrkyllisyysvaikutukset mitataan i) määrittämällä sameus kvalitatiivisesti, ii) määrittämällä epiteelivaurio kvalitatiivisesti, kun silmään lisätään fluoreseiiniä (fluoreseiinin retentio), iii) mittaamalla kvantitatiivisesti paksuuntuminen (turpoaminen) ja iv) arvioimalla kvalitatiivisesti pinnan makroskooppiset morfologiset vauriot. Sarveiskalvon sameus, turpoaminen ja vaurio arvioidaan testiaineelle altistuksen jälkeen erikseen ja yhdistetään sen jälkeen, jotta voidaan johtaa silmä-ärsytysluokitus.

3. ICE-menetelmällä on testattu myös silmää ärsyttäviä aineita, jotka aiheuttavat alle 21 päivässä palautuvia vaurioita ja aineita, jotka eivät ärsytä silmää. ICE-menetelmän tarkkuutta ja luotettavuutta näihin kategorioihin kuuluvien aineiden testauksessa ei ole kuitenkaan validoitu virallisesti.

4. Määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVIA HUOMIOITA JA RAJOITUKSIA

5. Tämä testimenetelmä perustuu ICCVAMin (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinointikomitea) ICE-testimenetelmäprotokollaan (8), joka kehitettiin kansainvälisen validointitutkimuksen perusteella (4)(5)(9). Tutkimukseen ovat osallistuneet vaihtoehtoisten menetelmien eurooppalainen validointikeskus, Japanin vastaava keskus ja Alankomaiden sovelletun luonnontieteen tutkimuslaitoksen TNO toksikologian ja sovelletun farmakologian elämän laatu -osasto. Protokolla perustuu julkaistuista protokollista ja TNO:n nykyisin käyttämästä protokollasta saatuihin tietoihin (10) (11) (12) (13) (14).

▼M2

6. Tämän menetelmän tunnistettuja rajoituksia ovat alkoholeille saatujen väärien positiivisten tulosten määrä ja kiinteille aineille ja pinta-aktiivisille aineille saatujen väärien negatiivisten tulosten määrä (ks. kohta 47) (4). Kun tietokannasta poistetaan näihin kemiallisiin ja fysikaalisiin luokkiin kuuluvat aineet, parantuu ICE-menetelmän tarkkuus EU:n, EPAn ja GHS:n luokitusjärjestelmissä huomattavasti (4). Koska tämän testin tarkoituksena on ainoastaan tunnistaa silmiä syövyttävät ja/tai silmiä vakavasti ärsyttävät aineet, väärät negatiiviset tulokset eivät haittaa, koska tällaiset aineet testattaisiin myöhemmin kaneilla tai muilla asianmukaisesti validoiduilla *in vitro* –testeillä sääntömääräisistä vaatimuksista riippuen käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa ja todistusnäytön arviointia. Nykyisen validointitietokannan avulla ei myöskään voida arvioida asianmukaisesti tiettyjä kemikaali- tai tuoteluokkia (esimerkiksi seoksia). Tutkijat voisivat kuitenkin harkita tätä testimenetelmää kaikentyyppisille testimateriaaleille, myös seoksille, jolloin positiivisen tuloksen voitaisiin katsoa viittaavan silmän syövytykseen tai vakavaan ärsytykseen. Alkoholeilla saatuihin positiivisiin tuloksiin olisi kuitenkin suhtauduttava varovaisesti yliennustuksen vaaran takia.

7. Kaikissa kanan silmiä käyttävissä menettelyissä olisi noudatettava testauslaitoksen määräämiä ihmis- tai eläinperäisten materiaalien (muun muassa muttei ainoastaan kudosten ja kudosnesteiden) käsittelyä koskevia sääntöjä ja menettelyjä. Suositellaan yleismaailmallisia laboratorioissa noudatettavia ennaltavarautumiskäytänteitä (15).

8. Eräs tämän testimenetelmän rajoitus on se, että vaikka siinä otetaan huomioon joitakin kanin silmä-ärsytystestissä arvioituja silmävaikutuksia ja jossain määrin niiden vakavuus, siinä ei tarkastella sidekalvon ja värikalvon vaurioita. On myös ehdotettu kaninsilmätutkimusten perusteella, että vaikka ICE-testissä ei sinänsä voida arvioida sarveiskalvovaurioiden palautuvuutta, voidaan kuitenkin arvioida sarveiskalvovaurion alkusyvyys ja sen avulla erottaa palautuvat ja palautumattomat vaikutukset (16). ICE-menetelmällä ei voida myöskään arvioida sitä, missä määrin silmäaltistukseen voi liittyä systeemistä myrkyllisyyttä.

9. ICE-testimenetelmän käyttökelpoisuutta ja rajoituksia ei-vakavien ärsyttävien aineiden ja ei-ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi pyritään selvittämään lisää (ks. myös kohta 48). Käyttäjiä rohkaistaan myös antamaan näytteitä ja/tai tuloksia validointijärjestöille, jotta ICE-testimenetelmän mahdollisia tulevia käyttötapoja, kuten ei-vakavien silmää ärsyttävien aineiden ja ei-ärsyttävien aineiden tunnistusta, voidaan arvioida virallisesti.

10. Kun laboratorio alkaa käyttää tätä määritysmenetelmää, sen olisi käytettävä lisäyksessä 2 mainittuja pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja. Laboratorio voi käyttää näitä kemikaaleja osoittaakseen teknisen pätevyytensä ICE-testin suorituksessa ennen kuin se toimittaa ICE-määritystuloksia sääntömääräistä vaaraluokitusta varten.

TESTIN PERIAATE

11. ICE-testimenetelmä on elinmalli, joka mahdollistaa kanan silmän lyhytaikaisen ylläpitämisen *in vitro*. Tässä testimenetelmässä testiaineen aiheuttama vaurio arvioidaan määrittämällä sarveiskalvon turpoaminen, sameus ja fluoreseiinin retentio. Kaksi jälkimmäistä muuttujaa arvioidaan kvalitatiivisesti, kun taas sarveiskalvon turpoaminen voidaan määrittää kvantitatiivisesti. Kukin mittaus joko muunnetaan kvantitatiiviseksi arvoksi yleisen ärsyttävyysindeksin laskemiseksi tai sille osoitetaan kvalitatiivinen kategoria, jonka avulla vahvistetaan sitten luokitus *in vitro* silmää syövyttäväksi ja vakavasti silmää ärsyttäväksi. Kummankin tuloksen avulla voidaan sitten ennustaa testiaineen *in vivo* -silmäsyövyttävyyttä ja kykyä aiheuttaa vakavaa ärsytystä (ks. päätöskriteerit).

▼M2

Kanansilmien lähde ja kanojen ikä

12. Tässä määrityksessä on tavanomaisesti käytetty teurastamosta saaduista kanoista (jotka on teurastettu elintarviketuotantoa varten) kerättyjä silmiä, jolloin ei ole tarvittu laboratorioeläimiä. Testiin voidaan käyttää vain silmiä, jotka on saatu terveistä, ihmisravinnoksi kelpaavista eläimistä.

13. Parasta kanan ikää ei ole arvioitu kontrolloidussa tutkimuksessa. Testimenetelmässä on tavanomaisesti käytetty sen ikäisiä ja painoisia kanoja kuin ovat siipikarjateurastamossa tavanomaisesti teurastetut kevätkananpojat (ts. noin 7 viikon ikäisiä, paino 1,5–2,5 kg).

Silmien kerääminen ja niiden kuljetus laboratorioon

14. Päät pitäisi irrottaa heti kanojen tainnutuksen jälkeen, mikä tehdään tavallisesti sähkösokilla, ja sen jälkeen, kun kaula on katkaistu verenlaskua varten. Olisi hyvä löytää laboratorion lähellä sijaitseva paikallinen kanojen teurastamo, jotta kanojen päät voidaan kuljettaa teurastamosta laboratorioon riittävän nopeasti, että pilaantuminen ja/tai bakteerikontaminaatio ovat mahdollisimman vähäisiä. Kananpäiden keräämisen ja silmien käytön (ICE-testissä) välisen ajan pitäisi olla mahdollisimman lyhyt (mieluiten alle kaksi tuntia), ja pitäisi osoittaa, etteivät määritystulokset ole sen takia epäluotettavia. Nämä tulokset perustuvat silmien valintaperusteisiin sekä positiivisten ja negatiivisten kontrollinäytteiden vasteisiin. Kaikkien määrityksessä käytettyjen silmien olisi oltava peräisin samasta tiettynä päivänä kerätystä silmäryhmästä.

15. Koska silmät dissekoidaan laboratoriossa, koskemattomat päät kuljetetaan teurastamosta ympäristön lämpötilassa muovilaatikoissa kosteutettuina isotonisella fysiologisella keittosuolaliuoksella kostutetuilla pyyheliinoilla.

ICE-testissä käytettävien silmien valintaperusteet

16. Silmät, jotka värjäytyvät voimakkaasti fluoreseiinillä (> 0,5) tai joiden sarveiskalvon sameus on korkea (> 0,5) silmämunan poistamisen jälkeen, hylätään.

17. Kussakin käsitellyssä ryhmässä ja samanaikaisesti määritettävässä positiivisessa kontrollissa on oltava vähintään kolme silmää. Negatiivisessa kontrolliryhmässä tai liuotinkontrollissa (jos käytetään muuta liuotinta kuin fysiologista keittosuolaliuosta) on oltava vähintään yksi silmä.

MENETTELY

Silmien valmistelu

18. Silmäluomet leikataan huolellisesti pois varoen vahingoittamasta sarveiskalvoa. Sarveiskalvon eheys arvioidaan nopeasti lisäämällä tippa 2-prosenttista (w/v) natriumfluoreseiiniä sarveiskalvon pinnalle muutamaksi sekunniksi, minkä jälkeen huuhdotaan isotonisella fysiologisella keittosuolaliuoksella. Fluoreseiinillä käsiteltyjä silmiä tarkastellaan rakovalomikroskoopilla, jotta voidaan varmistaa, ettei sarveiskalvo ole vahingoittunut (ts. fluoreseiinin retentio ja sarveiskalvon sameusarvo on enintään 0,5).

19. Jos silmä on vahingoittumaton, se dissekoidaan kallosta varoen vahingoittamasta sarveiskalvoa. Silmämuna vedetään irti silmäkuopasta pitäen tiukasti vilkkukalvosta kiinni kirurgisilla pihdeillä, ja silmän lihakset leikataan käyrillä, tylppäkärkisillä saksilla. On tärkeää, ettei sarveiskalvoa vahingoiteta liialla paineella (kompressioartefakta).

20. Kun silmää poistetaan silmäkuopasta, pitäisi osa näköhermoa jättää kiinni ja näkyville. Kun silmä on poistettu silmäkuopasta, se asetetaan imupaperialustalle, ja vilkkukalvo ja muu sidekudos leikataan pois.

▼M2

21. Silmämunasta poistettu silmä kiinnitetään ruostumattomasta teräksestä valmistettuun pitimeen siten, että sarveiskalvo on pystysuorassa. Pidin siirretään tiputuslaitteen (superfuusiolaite) kammioon (16). Pitimet asetetaan tiputuslaitteeseen siten, että koko sarveiskalvoon voidaan kohdistaa isotonisesta fysiologisesta keittosuolaliuoksesta koostuva tiputus. Tiputuslaitteen kammioiden lämpötila on pidettävä arvossa 32 ± 1,5°C. Lisäyksessä 3 esitetään kaavio tyypillisestä tiputuslaitteesta ja silmänpitimistä. Niitä saa kaupallisesti tai ne voi rakentaa itse. Laite voidaan mukauttaa yksittäisen laboratorion tarpeisiin (esimerkiksi useille silmille).

22. Kun silmät on asetettu tiputuslaitteeseen, niitä tarkastellaan jälleen rakovalomikroskoopilla, jotta voidaan varmistaa, etteivät ne ole vahingoittuneet dissektiossa. Sarveiskalvon paksuus sen kärjessä olisi myös mitattava rakovalomikroskooppiin kuuluvalla syvyydenmittauslaitteella. Jos silmien i) fluoreseiinin retentioarvo on yli 0.5; ii) sarveiskalvon sameus on yli 0.5; tai iii) silmissä on muita vahingoittumisen merkkejä, ne on vaihdettava toisiin. Niistä silmistä, joita ei ole hylätty edellä mainittujen kriteerien perusteella, hylätään sellaiset, joiden sarveiskalvon paksuus poikkeaa yli 10 prosentilla kaikkien silmien keskiarvosta. Käyttäjien pitäisi olla tietoisia siitä, että rakovalomikroskoopeilla voi saada erilaisia arvoja sarveiskalvon paksuudelle, jos raon leveyden asetus on erilainen. Raon leveys olisi asetettava arvoon 0,095 mm.

23. Kun kaikki silmät on tutkittu ja hyväksytty, silmiä inkuboidaan noin 45–60 min, jotta ne tasapainottuvat testijärjestelmässä ennen annostelua. Tasapainottumisjakson jälkeen otetaan sarveiskalvon paksuudelle ja sameudelle lukema perusarvoa varten (nolla-arvo ajanhetkellä 0). Dissektion yhteydessä määritettyä fluoreseiiniarvoa käytetään fluoreseiiniretention perusarvona.

Testiaineen annostelu

24. Välittömästi nolla-arvojen mittausten jälkeen silmä (telineineen) poistetaan tiputuslaitteesta, asetetaan vaakasuoraan, ja testiaine annostellaan sarveiskalvolle.

25. Nestemäiset testiaineet testataan tavallisesti laimentamattomina, mutta ne voidaan laimentaa tarvittaessa (esimerkiksi jos se kuuluu tutkimussuunnitelmaan). Aineet laimennetaan mieluiten fysiologisella keittosuolaliuoksella. Muitakin liuottimia voidaan käyttää valvotuissa olosuhteissa, mutta muiden liuottimien kuin fysiologisen keittosuolaliuoksen käyttökelpoisuus olisi osoitettava.

26. Nestemäiset testiaineet annostellaan sarveiskalvolle siten, että testiaine peittää kokonaan ja tasaisesti sarveiskalvon pinnan; tavallinen tilavuus on 0,03 ml.

27. Kiinteät aineet olisi mahdollisuuksien mukaan jauhettava mahdollisimman hienoksi morttelissa huhmareella tai vastaavalla jauhamislaitteella. Jauhe annostellaan sarveiskalvolle siten, että testiaine peittää pinnan tasaisesti; tavallinen määrä on 0,03 g.

28. Testiaineen (nesteen tai kiinteän aineen) annetaan vaikuttaa 10 sekunnin ajan, ja se huuhdellaan silmästä isotonisella fysiologisella keittosuolaliuoksella (noin 20 ml) huoneenlämpötilassa. Telineessä oleva silmä asetetaan uudelleen tiputuslaitteeseen pystysuoraan.

Kontrolliaineet

29. Kussakin kokeessa on oltava mukana negatiiviset eli liuotin/-vehikkelikontrollit ja positiiviset kontrollit.

▼M2

30. Testattaessa 100-prosenttisia nesteitä tai kiinteitä aineita käytetään ICE-testissä negatiivisena kontrollina fysiologista keittosuolaliuosta, jotta voidaan havaita epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä ja varmistaa, etteivät määritysolosuhteet aiheuta tahattomasti ärsytysvastetta.

31. Testattaessa laimennettuja nesteitä käytetään testissä samanaikaisesti liuotin/vehikkelikontrolliryhmää, jotta voidaan havaita epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä ja varmistaa, etteivät määritysolosuhteet aiheuta tahattomasti ärsytysvastetta. Kuten kohdassa 25 mainitaan, liuotinta/-vehikkeliä saa käyttää vain, jos on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää.

32. Kuhunkin kokeeseen otetaan mukaan tunnettu silmiä ärsyttävä aine positiivisena kontrollina, jotta voidaan varmistaa, että saadaan asianmukainen vaste. Koska ICE-määritystä käytetään tässä testimenetelmässä syövyttävien tai vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi, positiivisen kontrollin olisi mielellään oltava vertailuaine, joka aiheuttaa tässä testimenetelmässä vakavan vasteen. Vakava ärsytysvaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida. Positiivisesta kontrollista olisi hankittava riittävästi *in vitro* -tuloksia, jotta positiiviselle kontrollille voidaan laskea tilastollisesti määritelty hyväksyttävä alue. Jos tietylle positiiviselle kontrollille ei ole saatavilla riittävästi aiempia ICE-testimenetelmällä saatuja tuloksia, on tietojen saamiseksi mahdollisesti tehtävä lisätutkimuksia.

33. Nestemäisten testiaineiden positiivisina kontrolleina voidaan käyttää esimerkiksi 10-prosenttista etikkahappoa tai 5-prosenttista bentsalkoniumkloridia, ja kiinteiden aineiden positiivisina kontrolleina voidaan käyttää esimerkiksi natriumhydroksidia tai imidatsolia.

34. Vertailuaineet ovat hyödyllisiä, kun arvioidaan tiettyyn kemikaali- tai tuoteryhmään kuuluvien tuntemattomien kemikaalien silmä-ärsytyskykyä tai silmää ärsyttävän aineen suhteellista ärsytyskykyä tietyllä ärsytysvastealueella.

Mitatut päätepisteet

35. Käsitellyt sarveiskalvot arvioidaan ennen käsittelyä ja alkaen 30, 75, 120, 180 ja 240 minuuttia (± 5 minuuttia) käsittelyn jälkeen tehdyn huuhtelun jälkeen. Näillä ajankohdilla saadaan riittävä määrä mittauksia neljän tunnin käsittelyn aikana, ja mittauksien välillä on riittävästi aikaa tehdä kaikista silmistä tarvittavat havainnot.

36. Arvioidut päätepisteet ovat sarveiskalvon sameus, turpoaminen, fluoreseiinin retentio ja morfologiset vaikutukset (esimerkiksi epiteelin pistemäinen syöpyminen tai irtoaminen). Kaikki määritykset (lukuun ottamatta fluoreseiinin retentiota, joka määritetään vain ennen käsittelyä ja 30 minuutin kuluttua testiaineen annostelusta) tehdään kullakin mainitulla ajanhetkellä.

37. On suositeltavaa ottaa valokuvia osoitukseksi sarveiskalvon sameudesta, fluoreseiinin retentiosta, morfologisista muutoksista ja histopatologiasta (jos sellaisia tutkimuksia on tehty).

38. Kun viimeinen tutkimus on tehty neljän tunnin kohdalla, suositellaan, että silmät säilytetään sopivassa kiinnitysaineessa (esimerkiksi neutraalissa puskuroidussa formaliinissa), jotta voidaan mahdollisesti tehdä histopatologisia tutkimuksia.

▼**M2**

39. Sarveiskalvon turpoaminen arvioidaan sarveiskalvon paksuuden mittauksista, jotka tehdään rakovalomikroskooppiin kuuluvalla optisella paksuudenmittauslaitteella. Turpoaminen ilmoitetaan prosenttilukuna, ja se lasketaan sarveiskalvon paksuuden mittauksista seuraavalla kaavalla:

$$\left[\frac{\textit{sarveiskalvon paksuus hetkellat} - \textit{sarveiskalvon paksuus hetkellat} = 0}{\textit{sarveiskalvon paksuus hetkellat} = 0}\right] \times 100$$

40. Kaikkien testattujen silmien sarveiskalvon turpoamisen prosenttikeskiarvo lasketaan kaikille havaintojankohdille. Kullekin testiaineelle annetaan yleinen kategoriaa koskeva arvo sarveiskalvon turpoamiselle saadun korkeimman (minä tahansa ajankohtana havaitun) keskiarvon perusteella.

41. Sarveiskalvon sameus lasketaan käyttäen sitä sarveiskalvon alaa, joka antaa suurimman sameusarvon. Kaikkien testattujen silmien sarveiskalvon keskimääräinen sameusarvo lasketaan kaikille havaintoajankohdille. Kullekin testiaineelle annetaan yleinen kategoriaa koskeva arvo sarveiskalvon sameudelle saadun korkeimman (minä tahansa ajankohtana havaitun) keskimääräisen arvon perusteella (Taulukko 1).

Taulukko 1

Sarveiskalvon sameusarvot

Arvo	Havainto
0	Ei sameutta
0,5	Hyvin heikkoa sameutta
1	Hajanaisia sameita alueita; värikalvon yksityiskohdat selvästi nähtävissä
2	Selvästi erottuva läpikuultava alue; värikalvon yksityiskohdat hiukan hämäriä
3	Vakavaa sarveiskalvon sameutta; värikalvosta ei ole näkyvillä erityisiä yksityiskohtia; silmäterän kokoa voi tuskin erottaa
4	Täysin samea sarveiskalvo; silmäterää ei näy

42. Kaikkien testattujen silmien fluoreseiinin retention keskiarvo lasketaan ainoastaan 30 minuutin ajanhetkelle. Sitä käytetään kullekin testiaineelle annettavaan yleiseen kategoria-arvoon (taulukko 2).

Taulukko 2

Fluoreseiinin retention arvot

Arvo	Havainto
0	Ei fluoreseiinin retentiota
0,5	Hyvin vähäistä yksittäisten solujen värjääntymistä
1	Yksittäisiä värjääntyneitä soluja on hajaantuneena sarveiskalvon käsitellylle alueelle
2	Tiiviitä ja tiheitä yksittäisten värjääntyneiden solujen rykelmiä
3	Laajoja sarveiskalvon alueita, joilla esiintyy tiheää fluoreseiinivärjääntymistä

▼M2

43. Morfologisia vaikutuksia ovat esimerkiksi sarveiskalvon epiteelisolujen ”pistemäinen syöpyminen”, epiteelin ”irtoaminen”, sarveiskalvon pinnan ”karhentuminen” ja testiaineen ”takertuminen” sarveiskalvoon. Näiden löydösten vakavuus voi vaihdella, ja ne voivat esiintyä samanaikaisesti. Näiden löydösten luokittelu riippuu tutkijan tulkinnasta.

MITTAUSTULOKSET JA TESTISELOSTEET

Mittaustulosten arviointi

44. Sarveiskalvon sameutta, turpoamista ja fluoreseiinin retentiota koskevat tulokset olisi arvioitava erikseen, jotta kullekin päätepisteelle voidaan muodostaa ICE-luokka. Kutakin päätepistettä koskevat ICE-luokat yhdistetään sitten ärsytysluokituksen muodostamiseksi kullekin testiaineelle.

Päätöskriteerit

45. Kun kukin päätepiste on arvioitu, voidaan ICE-luokat osoittaa ennalta määrätyn vaihteluvälin perusteella. Sarveiskalvon paksuus (taulukko 3), sameus (taulukko 4) ja fluoreseiinin retentio (taulukko 5) ICE-luokkia käyttäen tulkitaan seuraavien asteikkojen mukaisesti:

Taulukko 3

ICE-luokituskriteerit sarveiskalvon paksuudelle

Keskimääräinen sarveiskalvon turpoaminen (%) (*)	ICE-luokka
0–5	I
> 5–12	II
> 12–18 (> 75 min käsittelyn jälkeen)	II
> 12–18 (≤ 75 min käsittelyn jälkeen)	III
> 18–26	III
> 26–32 (> 75 min käsittelyn jälkeen)	III
> 26–32 (≤ 75 min käsittelyn jälkeen)	IV
> 32	IV

(*) Sarveiskalvon turpoamisarvoja voi soveltaa vain, jos paksuus on mitattu Haag-Streit BP900 -rakovalomikroskoopilla, joka on varustettu syvyydenmittauslaitteella nro I, raon leveys asetettuna arvoon 9½, mikä vastaa 0,095 mm:iä. Käyttäjien pitäisi olla tietoisia siitä, että rakovalomikroskoopeilla voi saada erilaisia arvoja sarveiskalvon paksuudelle, jos raon leveyden asetus on erilainen.

Taulukko 4

ICE-luokituskriteerit sameudelle

Keskimääräinen suurin sameusarvo (*)	ICE-luokka
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Ks. taulukko 1.

▼**M2**

Taulukko 5

ICE-luokituskriteerit keskimääräiselle fluoreseiinin retentiolle

Keskimääräinen fluoreseiinin retentioarvo 30 minuuttia käsittelyn jälkeen (*)	ICE-luokka
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Ks. taulukko 2.

46. Testiaineen yhdistetty *in vitro* -ärsyttävyysluokitus arvioidaan lukemalla ärsyttävyysluokitus, joka vastaa sarveiskalvon turpoamiselle, sarveiskalvon sameudelle ja fluoreseiinin retentiolle saatujen kategorioiden yhdistelmää, soveltamalla taulukossa 6 esitettyä järjestelmää.

Taulukko 6

Yhdistetyt *in vitro* -ärsyttävyysluokitukset

Luokittelu	Kolmen päätepisteen yhdistelmät
Syövyttävä / vakavasti ärsyttävä	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Sarveiskalvon sameus ≥ 3, 30 minuutin kohdalla (vähintään kahdessa silmässä) Sarveiskalvon sameus = 4 millä tahansa mittausajankohdalla (vähintään kahdessa silmässä) Vakava epiteelin irtoaminen (vähintään yhdessä silmässä)

(*) Harvinaisemmat yhdistelmät.

47. Kuten 1 kohdassa mainittiin, jos testiainetta ei tunnisteta silmiä syövyttäväksi tai niitä vakavasti ärsyttäväksi, on testausta jatkettava luokitusta ja merkintöjen määräämistä varten. ICE-testimenetelmän yleinen tarkkuus on välillä 83 % (120/144) – 87 % (134/154), siinä saatujen väärien positiivisten tulosten määrä on välillä 6 % (7/122) – 8 % (9/116) ja väärien negatiivisten tulosten määrä välillä 41 % (13/32) – 50 % (15/30), kun menetelmää käytetään tunnistettaessa aineita silmää syövyttäviksi ja silmää vakavasti ärsyttäviksi, verrattuna kanin silmää *in vivo* käyttävällä testimenetelmällä saatuihin tuloksiin luokiteltuna EPAn (1), EU:n (2) tai GHS:n (3) luokitusjärjestelmien mukaan. Kun tietokannasta jätetään pois tiettyihin kemiallisiin (alkoholit, pinta-aktiiviset aineet) ja fysikaalisiin (kiinteät aineet) luokkiin kuuluvat aineet, ICE-menetelmän tarkkuus EPAn, EU:n ja GHS:n luokitusjärjestelmissä vaihtelee väillä 91 % (75/82) – 92 % (69/75), väärien positiivisten tulosten määrä on välillä 5 % (4/73) – 6 % (4/70) ja väärien negatiivisten tulosten määrä välillä 29 % (2/7) – 33 % (3/9) (4).

48. Vaikka testiaineelle ei saataisi luokitusta silmiä syövyttäväksi tai niitä vakavasti ärsyttäväksi aineeksi, ICE-menetelmässä saaduista tuloksista voi olla hyötyä käytettynä yhdessä *in vivo* -kaninsilmätestissä tai asianmukaisesti validoidussa *in vitro* -testissä saatujen testitulosten kanssa, kun arvioidaan ICE-menetelmän käyttökelpoisuutta ja rajoituksia muiden kuin vakavasti ärsyttävien ja ei-ärsyttävien aineiden tunnistamisessa (valmisteilla on ohjeet *in vitro* -silmämyrkyllisyystestimenetelmien käytöstä).

▼M2

Tutkimuksen hyväksymiskriteerit

49. Testiä pidetään hyväksyttävänä, jos samanaikaisesti tehtyjen negatiivisten tai liuotin/vehikkelikontrollien antama ärsyttävyysluokitus on ”ei ärsyttävä” ja samanaikaisesti tehtyjen positiivisten kontrollien antama ärsyttävyysluokitus on ”vakavasti ärsyttävä / syövyttävä”.

Testiseloste

50. Testiselosteessa olisi annettava seuraavat tiedot, jos ne ovat merkityksellisiä tutkimuksen suorittamiselle:

Testi- ja kontrolliaineet

Kemiallinen nimi (nimet), kuten CAS:n (Chemical Abstracts Service) käyttämä rakennetta kuvaava nimi, jonka jälkeen annetaan muut nimet, jos ne tunnetaan;

CAS-numero, jos se tunnetaan;

Aineen tai seoksen puhtausaste tai koostumus (painoprosentteina), jos tieto on saatavilla;

Testin suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet, kuten olomuoto, haihtuvuus, pH, stabiilius, kemiallinen luokka ja vesiliukoisuus;

Tarvittaessa testi- ja/tai kontrolliaineiden käsittely ennen testiä (esim. lämmittäminen tai jauhaminen);

Stabiilius, jos se tiedetään.

Sponsoria ja testauslaitosta koskevat tiedot:

Sponsorin nimi ja osoite, testilaitos ja tutkimusjohtaja;

Silmien lähde (esimerkiksi laitos, josta ne on kerätty);

Silmien säilytys- ja kuljetusolosuhteet (kuten silmien keräyspäivä ja kellonaika, aika, joka on kulunut keräyksestä siihen asti, kun testi aloitettiin);

Erityistietoja eläimistä, joista silmät on kerätty (kuten ikä, sukupuoli, paino), jos tiedot ovat saatavilla.

Käytetyn testimenetelmän ja protokollan perustelu

Testimenetelmän integriteetti

Menettely, jolla testimenetelmän integriteetti (ts. tarkkuus ja luotettavuus) ajan suhteen varmistetaan (esimerkiksi pätevöittämiseen käytettyjen aineiden säännöllinen testaus, aiempien negatiivisten ja positiivisten kontrollitulosten käyttö).

Hyväksyttävän testin kriteerit

Tapauksen mukaan hyväksyttävät aiempiin tuloksiin perustuvat samaan aikaan tehtyjen vertailukontrollien vaihteluvälit.

Testausolosuhteet

Kuvaus käytetystä testijärjestelmästä;

Käytetty rakovalomikroskooppi (esimerkiksi sen malli);

Käytetyn rakovalomikroskoopin laiteasetukset;

Käytettyjä kanan silmiä koskevat tiedot, myös niiden laatua koskeva lausuma;

▼**M2**

Käytetty testimenettely yksityiskohtaisesti;

Käytetyt testiainekonsentraatiot;

Kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista;

Viittaus mallia koskeviin aiempiin tuloksiin (esimerkiksi negatiiviset ja positiiviset kontrollit, pätevöittämiseen käytetyt aineet, vertailuaineet);

Kuvaus käytetyistä arviointikriteereistä.

Tulokset

Kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

Tarvittaessa valokuvat silmistä.

Tulosten tarkastelu

Päätelmä

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(2) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta. EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

(3) Yhdistyneet Kansakunnat (YK) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York ja Geneve, 2007. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(6) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006, annettu 18 päivänä joulukuuta 2006, kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta. EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

▼M2

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼**M2**

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe IrritantsIsolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Saatavilla seuraavassa osoitteessa:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuudella mitataan testimenetelmän suoritusta, ja se on eräs ”relevanssin” näkökohta. Termiä käytetään usein ”konkordanssin” kanssa vaihtoehtoisena, jolloin sillä tarkoitetaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta.

Vertailuaine: Aine, johon testiainetta verrataan. Vertailuaineella olisi oltava seuraavat ominaisuudet: i) se saadaan vakaana pysyvästä ja luotettavasta lähteestä; ii) sen rakenne ja toiminta ovat samankaltaisia testattavan aineluokan kanssa; iii) sen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tunnetaan; iv) se tukee tunnetuista vaikutuksista saatuja tietoja; ja v) sen vaikutuskyky halutun vasteen vaihtelualueella tunnetaan.

Sarveiskalvo: Silmämunan etuosan läpinäkyvä osa, joka peittää värikalvon ja silmäterän ja päästää valoa sisäosiin.

Sarveiskalvon sameus: Sarveiskalvon sameuden mitta, kun sarveiskalvo on altistettu testiaineelle. Sarveiskalvon sameuden lisääntyminen merkitsee sarveiskalvon vauriota.

Sarveiskalvon turpoaminen: ICE-testissä objektiivisesti mitattu sarveiskalvon pullistumisen määrä, kun sarveiskalvo on altistettu testiaineelle. Turpoaminen ilmaistaan prosenttilukuna ja lasketaan sarveiskalvon paksuuden perustasomittauksista (ennen annostelua) ja paksuuksista, jotka on mitattu säännöllisin väliajoin sen jälkeen, kun sarveiskalvo on altistettu testiaineelle ICE-testissä. Sarveiskalvon turpoamisaste osoittaa sarveiskalvon vauriota.

EPA-kategoria 1: Syövyttävä (palautumaton silmäkudoksen tuhoutuminen) tai yli 21 vuorokautta kestävä sarveiskalvoon kohdistuva vaikutus tai ärsytys (1).

EU:n R41-luokka: Silmän kudosvauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta (2).

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Niiden positiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Väärien positiivisten tulosten osuus on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattori.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Kaikkien negatiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Väärien positiivisten tulosten osuus on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattori.

Fluoreseiinin retentio: ICE-testissä tehty subjektiivinen mittaus fluoreseiininatriumin määrästä, jonka epiteelisolut pidättävät sarveiskalvossa, kun se on altistettu testiaineelle. Sarveiskalvon turpoamisaste osoittaa sarveiskalvon epiteelin vauriota.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Järjestelmä, jossa ehdotetaan kemikaalien (aineet ja seokset) luokitusta fysikaalisten, terveyteen ja ympäristöön liittyvien vaarojen standardityyppien ja -tasojen mukaisesti ja osoitetaan niille vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien kielteisistä vaikutuksista ihmisten (mukaan luettuina työnantajat, työntekijät, kuljettajat, kuluttajat ja pelastushenkilöstö) ja ympäristön suojelemiseksi (3).

▼M2

GHS-kategoria 1: Silmän kudosvauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta (3).

Vaara: Vaikuttavan tekijän (”agentin”) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Negatiivinen kontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat. Negatiivinen kontrolli prosessoidaan testiaineella käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, reagoiko liuotin testijärjestelmän kanssa.

Ei-ärsyttävä: Aineet, joita ei ole luokiteltu EPA-järjestelmän kategoriaan I, II tai III; EU:n kategoriaan R41 tai R36; tai GHS:n kategoriaan 1, 2A tai 2B silmää ärsyttäväksi aineeksi (1)(2)(3).

Silmää syövyttävä aine: a) Aine, joka aiheuttaa silmään palautumatonta kudosvauriota; b) aineet, jotka on luokiteltu GHS:n kategoriaan 1, EPAn kategoriaan I tai EU:n kategoriaan R41 silmää ärsyttäviksi aineiksi (1) (2) (3).

Silmää ärsyttävä aine: a) Aine, joka aiheuttaa silmään palautuvan muutoksen, kun sitä on annosteltu silmän etupinnalle; b) aineet, jotka on luokiteltu EPA-järjestelmän kategoriaan II tai III; EU:n kategoriaan R36; tai GHS:n kategoriaan 1, 2A tai 2B silmää ärsyttäväksi aineeksi (1)(2)(3).

Silmää vakavasti ärsyttävä aine: a) Aine, joka aiheuttaa silmän etupinnalle annosteltuna kudosvauriota, joka ei korjaudu 21 päivän kuluessa annostelusta tai joka aiheuttaa näkökyvyn vakavaa fyysistä rappiota; b) aineet, jotka on luokiteltu GHS:n kategoriaan 1, EPAn kategoriaan I tai EU:n kategoriaan R41 silmää ärsyttäviksi aineiksi (1) (2) (3).

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vakava vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Luotettavuus: Arvo, joka osoittaa, missä määrin testimenetelmä pystytään suorittamaan uusittavalla tavalla samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus.

Rakovalomikroskooppi: Laite, jolla tarkastellaan silmää suoraan kaksiokulaarisen mikroskoopin suurennoksella luomalla stereoskooppinen, pysty kuva. Laitetta käytetään ICE-testissä kanan silmän etukammion tarkasteluun ja sarveiskalvon paksuuden objektiiviseen mittaukseen mikroskooppiin liitetyn syvyyttä mittaavan laitteen avulla.

Liuotin/vehikkelikontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, mukaan luettuina liuotin tai vehikkeli, ja joka prosessoidaan testiaineella käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testiaine on liuotettu samaan liuottimeen tai vehikkeliin. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti negatiivisen kontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai vehikkeli testijärjestelmän kanssa.

▼**M2**

Vaiheittainen testaus: Vaiheittainen testausstrategia, jossa kaikkia testiainetta koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen todistusnäyttöprosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Jos testiaineen ärsytyskyky voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, ei lisätestausta tarvita. Jos testiaineen ärsytyskykyä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määritellä aukottomasti.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka validointitutkimukset on saatettu päätökseen ja relevanssi (tarkkuus mukaan luettuna) ja luotettavuus tiettyä tarkoitusta varten on määritetty. On tärkeää huomata, että validoitu testi ei ehkä ole riittävän tarkka ja luotettava, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen.

Todistusnäyttö: Prosessi, jossa tarkastellaan erilaisten tietojen vahvuuksia ja heikkouksia, kun niiden avulla on tarkoitus päättää aineen vaarallisuutta koskevasta päätelmästä tai kun tietojen on määrä tukea kyseistä päätelmää.

▼**M2**

Lisäys 2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT KEMIKAALIT ICE-TESTIMENETELMÄLLE

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tähän testimenetelmään perustuvaa menetelmää rutiininomaisesti, se voi osoittaa teknisen pätevyytensä määrittämällä oikein taulukossa 1 suositeltujen 10 aineen silmäsyövyttävyysluokituksen. Aineet on valittu siten, että ne edustavat sellaisia paikallisen silmä-ärsytyksen ja/tai-syövytyksen vasteita, jotka perustuvat *in vivo* kaninsilmätestissä (TG 405) saatuihin tuloksiin (ts. YK:n GHS-järjestelmän kategoriat 1, 2A, 2B tai ”Ei luokiteltu ja merkitty”) (3) (7). Kun otetaan huomioon näiden määritysten validoitu hyödyllisyys (ts. ainoastaan silmää syövyttävien ja/tai silmää vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamista varten), vain kahta luokitustarkoituksiin käytettävää testitulosta (syövyttävät ja/tai silmää vakavasti ärsyttävät aineet tai ei-syövyttävät ja/tai ei vakavasti ärsyttävät aineet) käytetään pätevyyden osoittamiseksi. Muita valintakriteerejä ovat se, että aineet ovat kaupallisesti saatavilla, että saatavilla on laadukkaita *in vivo* -vertailutietoja ja että on laadukkaita tietoja niistä kahdesta *in vitro* -menetelmästä, joille parhaillaan kehitetään testiohjeita. Tästä syystä ärsyttävät aineet silmätoksisuuden *in vitro* -testimenetelmien validointiin valittiin ICCVAM:n 122 suositellun vertailuaineen luettelosta (ks. lisäys H, ICCVAM:n suositeltujen vertailuaineiden luettelo) (4). Vertailutiedot ovat saatavilla naudan sarveiskalvon sameus- ja läpäisevyysmenetelmälle (BCOP) ja ICE-menetelmälle laadituista tausta-asiakirjoista (18) (19).

Taulukko 1

Suositellut aineet ICE-menetelmän teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka ([1])	Fysikaalinen olomuoto:	*In vivo* -luokitus ([2])	*In vitro* -luokitus ([3])
Bentsalkoniumkloridi (5 %)	8001-54-5	Oniumyhdiste	Neste	Kategoria 1	Syövyttävä/vakavasti ärsyttävä
Klooriheksidiini	55-56-1	Amiini, amidiini	Kiinteä	Kategoria 1	Syövyttävä/vakavasti ärsyttävä
Dibentsoyyli-L-viinihappo	2743-38-6	Karboksyylihappo, esteri	Kiinteä	Kategoria 1	Syövyttävä/vakavasti ärsyttävä
Imidatsoli	288-32-4	Heterosyklinen	Kiinteä	Kategoria 1	Syövyttävä/vakavasti ärsyttävä
Trikloorietikkahappo (30 %)	76-03-9	Karboksyylihapot	Neste	Kategoria 1	Syövyttävä/vakavasti ärsyttävä
2,6-Diklooribentsoyylikloridi	4659-45-4	Asyylihalidi	Neste	Kategoria 2A	Ei syövyttävä/ei-vakavasti ärsyttävä
Etyyli-2-metyyliasetoasetaatti	609-14-3	Ketoni, esteri	Neste	Kategoria 2B	Ei syövyttävä/ei-vakavasti ärsyttävä
Ammoniumnitraatti	6484-52-2	Epäorgaaninen suola	Kiinteä	Kategoria 2A	Ei syövyttävä/ei-vakavasti ärsyttävä

▼**M2**

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka ([1])	Fysikaalinen olomuoto:	*In vivo* -luokitus ([2])	*In vitro* -luokitus ([3])
Glyseroli	56-81-5	Alkoholi	Neste	Ei merkintää	Ei syövyttävä/ei-vakavasti ärsyttävä
n-Heksaani	110-54-3	Hiilivety (asyklinen)	Neste	Ei merkintää	Ei syövyttävä/ei-vakavasti ärsyttävä

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

([1]) Kunkin testiaineen kemiallinen luokka määritettiin National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) -luokitusjärjestelmään (saatavilla osoitteessa http//www.nlm.nih.gov/mesh) perustuvan tavanomaisen luokitusjärjestelmän perusteella.

([2]) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu kanin silmällä tehdyllä *in vivo* -testillä (OECD TG 405) käyttäen YK:n GHS-järjestelmää (3)(7).

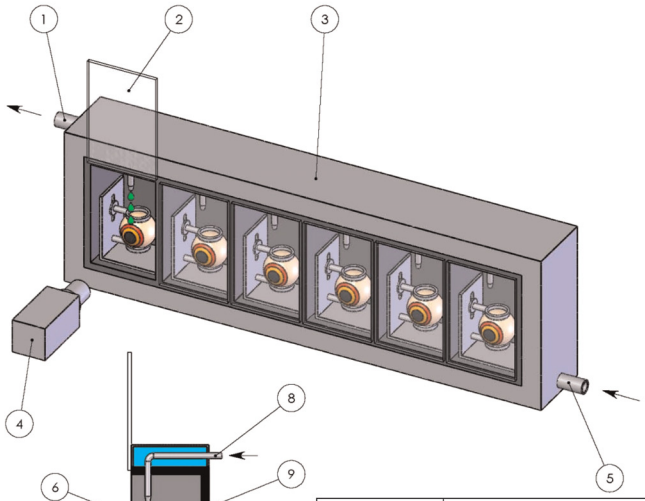
([3]) Perustuu BCOP- ja ICE-testien tuloksiin.

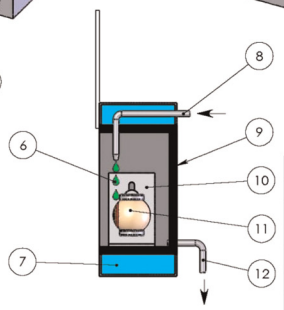
▼M2

Lisäys 3

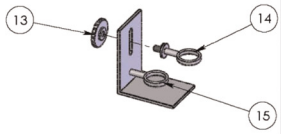
ICE-testissä käytetyn tiputuslaitteen ja silmänpitimien kaaviot

(ks. Burton et al. (17), jossa esitetään yleinen kuvaus tiputuslaitteesta ja silmänpitimestä)





OSASTON LÄPILEIKKAUS



SILMÄNPIDIN

OSAN NRO	KUVAUS
1	LÄMPIMÄN VEDEN ULOSTULO
2	LIUKUOVI
3	TIPUTUSLAITE
4	OPTINEN MITTAUSLAITE
5	LÄMPIMÄN VEDEN SISÄÄNMENO
6	FYSIOLOGINEN KEITTOSUOLALIUOS
7	LÄMMIN VESI
8	FYSIOLOGISEN KEITTOSUOLALIUOKSEN SISÄÄNMENO
9	OSASTO
10	SILMÄNPIDIN
11	KANAN SILMÄ
12	FYSIOLOGISEN KEITTOSUOLALIUOKSEN ULOSTULO
13	SÄÄTÖRUUVI
14	SÄÄDETTÄVÄ YLÄOSA
15	KIINTEÄ ALAOSA”

▼M3

B.49. *IN VITRO* -MIKROTUMATESTI NISÄKÄSSOLUILLA

JOHDANTO

1. *In vitro* -mikrotumamääritysmenetelmä (MNvit) on genotoksisuustesti, jolla määritetään interfaasisolujen sytoplasman mikrotumat. Mikrotumat voivat olla peräisin asentrisista kromosomin osista (joista puuttuu sentromeeri) tai kokonaisista kromosomeista, jotka eivät pysty vetäytymään kohti napoja solunjakautumisen anafaasivaiheessa. Määritysmenetelmässä osoitetaan klastogeenisten ja aneugeenisten kemikaalien (aineiden ja seosten) (1) (2) aktiivisuus soluissa, joissa on tapahtunut solun jakautuminen testiaineelle altistumisen aikana tai sen jälkeen. Testi voidaan suorittaa niin, että aktiinin polymerisaation inhibiittoria sytokalasiini B:tä (sytoB) käytetään tai ei käytetä. Kun sytoB:tä lisätään ennen tavoiteltua mitoosia, mikrotumafrekvenssi voidaan määrittää ja analysoida valikoivasti soluissa, joissa on tapahtunut yksi mitoosi, koska tällaiset solut ovat kaksitumaisia (3) (4). Tässä testimenetelmässä testisuunnitelmia voidaan soveltaa myös ilman sytokineesin inhibitointia edellyttäen, että analysoitavassa solupopulaatiossa on todistetusti tapahtunut mitoosi.

2. Mikrotumien muodostumista aiheuttavien kemikaalien (aineiden ja seosten) tunnistamiseksi toteutettavan MNvit-määritysmenetelmän lisäksi kromosomivaurioiden ja mikrotuman muodostumisen mekanismeista voidaan saada tietoa myös käyttämällä sytokineesin inhibiittoria, kinetokorien immunokemiallista merkkausta tai sentromeeri-/telomeerikoettimilla suoritettavaa hybridisaatiota (fluoresenssi- *in situ* -hybridisaatio (FISH)) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Merkkaus- ja hybridisaatiomenetelmiä voidaan käyttää, kun mikrotumien muodostuminen on kiihtynyt ja tutkija haluaa määrittää, johtuuko kiihtyminen klastogeenisista ja/tai aneugeenisista tapahtumista.

3. Mikrotumat edustavat vauriota, jotka ovat välittyneet tytärsoluihin. Sen sijaan metafaasivaiheen soluissa esiintyvät kromosomipoikkeavuudet eivät ehkä välity seuraaviin vaiheisiin. Koska interfaasisolujen mikrotumat voidaan havaita suhteellisen objektiivisesti, laboratorion henkilökunnan on vain määritettävä, ovatko solut jakautuneet ja kuinka monessa solussa on mikrotuma. Näin ollen preparaatit voidaan laskea suhteellisen nopeasti ja analysointi voidaan automatisoida. Tämän takia kussakin käsittelyssä voidaan laskea satojen solujen sijaan tuhansia soluja, mikä lisää määritysmenetelmän tehokkuutta. Koska mikrotumia voi syntyä hitaasti liikkuvista (”lagging”) kromosomeista, menetelmällä voidaan havaita aneuploidisia tekijöitä, joita on vaikea tutkia perinteisillä kromosomipoikkeavuustesteillä, kuten OECD:n testiohjeella 473 (tämän liitteen B.10 luku) (17). MNvit-määritysmenetelmällä ei kuitenkaan voida eritellä polyploidisia kemikaaleja ja klastogeenisia kemikaaleja ilman erityistekniikoita, kuten 2 kohdassa tarkoitettua FISH-tekniikkaa.

4. MNvit-määritysmenetelmä on *in vitro* -menetelmä, jossa tavallisesti käytetään viljeltyjä ihmis- tai jyrsijäsoluja. Sillä voidaan kattavasti tutkia *in vitro* kromosomivaurioiden mahdollisuutta, koska sillä voidaan havaita sekä aneugeenit että klastogeenit.

5. MNvit-määritysmenetelmässä voidaan käyttää luotettavasti ja tehokkaasti useita eri solutyyppejä joko sytoB:n kanssa tai ilman sitä. Erilaisten jyrsijäsolulinjojen (CHO, V79, CHL/IU ja L5178Y) ja ihmisestä saatujen lymfosyyttien käytön soveltuvuudesta MNvit-määritysmenetelmään on saatu kattavia todisteita (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Näitä ovat etenkin Société Française de Toxicologie Génétique -järjestön (SFTG) koordinoimat kansainväliset validointitutkimukset (18) (19) (20) (21) (22) sekä genotoksisuuden testausta käsittelevän kansainvälisen työryhmän (International Workshop on Genotoxicity Testing)

▼M3

selvitykset (4) (16). Saatavilla olevat tiedot on myös arvioitu uudelleen Euroopan komission alaisen Euroopan vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskuksen (ECVAM) tekemässä todistusnäytön jälkivalidointitutkimuksessa, ja ECVAM:in tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC) on vahvistanut testimenetelmän tieteellisesti päteväksi (32) (33) (34). Menetelmässä kuvataan ihmisen lymfoblasti-TK6-solulinjan (35), HepG2-solujen (36) (37) ja syyrianhamsterialkion primaarisolujen (38) käyttöä, vaikka niitä ei ole käytetty validointitutkimuksissa.

MÄÄRITELMÄT

6. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

JOHDANTO

7. *In vitro* -testit edellyttävät yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää, ellei solujen metabolia sovellu kyseisten aineiden testaamiseen. Eksogeeninen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei täysin jäljittele *in vivo* -olosuhteita. On myös vältettävä olosuhteita, joissa väärät positiiviset tulokset eivät heijasta luontaista mutageenisuutta, vaan voivat johtua esimerkiksi pH-arvon tai osmolaliteetin huomattavasta muutoksesta tai sytotoksisuuden korkeasta tasosta (39) (40) (41). Jos testikemikaali aiheuttaa viljelyaineen pH-arvon muuttumisen lisäämishetkellä, pH-arvoa on mukautettava mielellään siten, että kantaliuosta puskuroidaan niin, että kaikkien testinäytteiden, myös kaikkien kontrollinäytteiden, tilavuus pysyy muuttumattomana.

8. Mikrotumien muodostumisen analysoimiseksi on tärkeää, että sekä käsitellyissä että käsittelemättömissä viljelmissä on tapahtunut mitoosi. Eniten tietoja mikrotumien laskemiseksi saadaan soluista, joissa on tapahtunut yksi mitoosi testiaineella käsittelyn aikana tai sen jälkeen.

TESTIN PERIAATE

9. Ihmis- tai nisäkäsperäiset soluviljelmät altistetaan testiaineelle sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän kanssa että ilman sitä, paitsi jos testissä käytetään soluja, joiden metabolointikyky on riittävä. Kaikissa testeissä käytetään samanaikaisesti myös liuotinta/kantaja-ainekontrollia ja positiivisia kontrollikemikaaleja.

10. Testiaineelle altistamisen aikana tai sen jälkeen soluja kasvatetaan riittävän kauan, jotta kromosomi- tai sukkulavauriot voivat johtaa mikrotuman muodostumiseen inferfaasisoluissa. Jotta aneuploidia muodostuisi, testiaineen olisi yleensä oltava läsnä mitoosin aikana. Kerätyt ja värjätyt interfaasisolut analysoidaan mikrotumien havaitsemiseksi. Mikrotumat on laskettava pääasiassa vain niissä soluissa, joissa mitoosi on päättynyt testiaineelle altistamisen aikana tai altistamisen jälkeisessä vaiheessa, jos testissä käytetään sitä. Sytokineesin inhibiittorilla käsitellyistä viljelmistä lasketaan vain kaksitumaiset solut. Jos sytokineesin inhibiittoria ei ole käytetty, on tärkeä osoittaa, että analysoiduissa soluissa on todennäköisesti tapahtunut solunjakautuminen testiaineelle altistumisen aikana tai sen jälkeen. Kaikkien menetelmissä on tärkeä osoittaa, että solut ovat lisääntyneet sekä kontrolliviljelmässä että käsitellyissä viljelmissä, ja testiaineen aiheuttamaa sytotoksisuutta tai sytostaasia on arvioitava niissä viljelmissä (tai rinnakkaisviljelmissä), joiden mikrotumat lasketaan.

▼M3

MÄÄRITYSMENETELMÄN KUVAUS

Testin valmistelu

11. Testeissä voidaan käyttää viljeltyjä ihmisen perifeerisen veren primaarisia lymfosyyttejä (5) (19) (42) (43) ja erilaisten jyrsijäsolulinjojen (esimerkiksi CHO, V79, CHL/IU ja L5178Y) soluja (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Muiden solulinjojen ja -tyyppien käyttö on perusteltava esittäen tiedot niiden todistetusta suorituskyvystä määritysmenetelmässä Hyväksyttävyysperusteet -kohdan mukaisesti. Koska mikrotumien esiintymistaajuus vaikuttaa taustana määritysmenetelmän herkkyyteen, menetelmässä olisi käytettävä solutyyppejä, joissa mikrotumien muodostumisen taustataajuus on alhainen ja tasainen.

12. Ihmisen perifeerisen veren lymfosyytit on kerättävä nuorilta (noin 18–35-vuotiaat), terveiltä, tupakoimattomilta henkilöiltä, joiden ei tiedetä altistuneen äskettäin genotoksisille kemikaaleille tai säteilylle. Jos soluja kerätään useammalta kuin yhdeltä luovuttajalta, luovuttajien määrä on ilmoitettava. Mikrotumataajuus kasvaa iän myötä, ja ilmiö on yleisempi naisilla kuin miehillä (44). Tämä on otettava huomioon valittaessa luovuttajien soluja, jos ne on tarkoitus yhdistää.

Elatusaineet ja viljelyolosuhteet

13. Soluviljelmiä on viljeltävä sopivissa elatusaineissa ja inkubaatio-olosuhteissa (kasvatusastiat, CO_2-pitoisuus, lämpötila ja kosteus). Pysyvistä solulinjoista ja kannoista on tarkistettava ajoittain modaalisen kromosomimäärän pysyvyys ja varmistettava, ettei ole mykoplasmakontaminaatiota. Viljelmiä ei pidä käyttää, jos ne ovat kontaminoituneet tai jos modaalinen kromosomimäärä on muuttunut. Normaali solusyklin kesto testauslaboratoriossa käytetyissä viljelyolosuhteissa on tunnettava. Jos menetelmänä käytetään sytokineesin estämistä, sytokineesin inhibiittorin pitoisuus on optimoitava tiettyä solutyyppiä varten, ja on osoitettava, että sillä saadaan aikaan riittävä määrä kaksitumaisia soluja pisteytystä varten.

Soluviljelmien valmistelu

14. Pysyvät solulinjat ja solukannat: solut kasvatetaan kantaviljelmistä, kylvetään elatusaineeseen sellaiseen tiheyteen, että soluviljelmät eivät saavuta konfluenttisuutta yhden solun vahvuisessa kerroksessa eivätkä kasvatusviljelmät ole liian tiheitä ennen solujen keräämisajankohtaa, ja inkuboidaan 37 °C:ssa.

15. Lymfosyytit: antikoagulantilla (esimerkiksi hepariinilla) käsiteltyä kokoverta tai erotettuja lymfosyyttejä viljellään mitogeenin (esimerkiksi fytohemagglutiniini, PHA) kanssa ennen testiaineelle ja sytoB:lle altistamista.

Metabolinen aktivaatio

16. Jos solujen endogeeninen metabolointikyky ei ole riittävä, on käytettävä eksogeenisia metabolisia järjestelmiä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (45) (46) tai fenobarbitonin ja β-naftoflavonin yhdistelmällä (46) (47) (48) (49) käsiteltyjen jyrsijöiden maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Jälkimmäisenä mainittu yhdistelmä ei ole ristiriidassa pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskevan Tukholman yleissopimuksen (50) ja pysyvistä orgaanisista yhdisteistä annetun asetuksen (EY) N:o 850/2004 (66) säännösten kanssa, ja sen on osoitettu indusoivan sekaoksidaasia yhtä tehokkaasti kuin Aroclor 1254:n (46) (47) (48) (49). S9-jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue lopullisessa testiväliaineessa on 1–10 % (v/v). Metabolisen aktivaatiojärjestelmän kunto voi riippua testattavan kemikaalin luokasta, ja joissakin tapauksissa saattaa olla perusteltua käyttää useampaa kuin yhtä S9-jakeen pitoisuutta.

▼M3

17. Jos käytössä on spesifisiä ihmisen tai jyrsijöiden aktivoivia entsyymejä ilmentäviä geenitekniikalla tuotettuja solulinjoja, ei eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää välttämättä tarvita, ja näitä soluja voidaan myös käyttää testisoluina. Tällaisissa tapauksissa käytettyjen solulinjojen valinta on perusteltava tieteellisesti, esimerkiksi ilmoittamalla sekaoksidaasin merkitys testiaineen (51) metabolialle ja niiden reagoivuus tunnettuihin klastogeeneihin ja aneugeeneihin (katso erillinen Hyväksyttävyysperusteet-kohta). On mahdollista, että ilmentyvä(t) sekaoksidaasi(t) ei(vät) pysty metaboloimaan testiainetta; tässä tapauksessa negatiiviset tulokset eivät osoita, että testiaineella ei voida indusoida mikrotumia.

Testiaineen valmistelu

18. Kiinteät kemikaalit on liuotettava tai sekoitettava sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja tarvittaessa laimennettava ennen solujen käsittelyä. Nestemäiset kemikaalit voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen solujen käsittelyä. Kaasujen tai haituvien kemikaalien testauksessa standardimenettelyihin on tehtävä asianmukaisia mukautuksia. Kyseiset kaasut tai kemikaalit on esimerkiksi käsiteltävä suljetuissa astioissa (52) (53). Testiaine on valmisteltava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

Testiolosuhteet

Liuottimet/kantaja-aineet

19. Liuotin/kantaja-aine ei saisi reagoida testiaineen kanssa tai vaikuttaa solujen elinkykyyn tai S9:n aktiivisuuteen käytetyssä pitoisuudessa. Jos testissä käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita (esimerkiksi vettä, soluviljelmän elatusainetta tai dimetyylisulfoksidia), niiden käyttö on perusteltava tiedoilla, joilla osoitetaan, että ne ja testiaine sopivat yhteen ja että ne eivät ole genotoksisia. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista.

SytoB:n käyttö sytokineesin inhibiittorina

20. Yhtenä MNvit-määritysmenetelmän tärkeimpänä näkökohtana on varmistaa, että lasketuissa soluissa on tapahtunut mitoosi käsittelyn aikana tai käsittelyä seuraavalla inkubaatiojaksolla, jos sitä on käytetty. Sytokineesin inhibiittorina käytetään yleisimmin sytoB:tä, koska se estää aktiinin muodostumisen ja näin ollen estää tytärsolujen erkaantumisen mitoosin jälkeen, mikä johtaa kaksitumaisten solujen muodostumiseen (5) (54) (55). Tämän ansiosta mikrotumien laskeminen voidaan rajoittaa soluihin, joissa on tapahtunut mitoosi käsittelyn aikana tai sen jälkeen. Testiaineen vaikutus solujen proliferaation kinetiikkaan voidaan mitata samanaikaisesti. Ihmisen lymfosyyttejä käytettäessä sytokineesin inhibiittorina on käytettävä sytoB:tä, koska solusyklin kesto vaihtelee eri viljelmien ja luovuttajien välillä ja koska kaikki lymfosyytit eivät reagoi PHA:han. Solulinjojen testauksessa on käytetty myös muita menetelmiä sen määrittämiseksi, ovatko laskettavat solut jakautuneet; näitä menetelmiä tarkastellaan jäljempänä (katso 26 kohta).

21. Laboratorion on määritettävä sopiva sytoB:n pitoisuus erikseen kullekin solutyypille, jotta liuottimella/kantaja-aineella käsiteltyjen kontrolliviljelmien kaksitumaisten solujen määrä voidaan optimoida. Yleensä sytoB:n sopiva pitoisuus on 3–6 μg/ml.

▼M3

Solujen proliferaation ja sytotoksisuuden mittaaminen ja altistuspitoisuuksien valitseminen

22. Päätettäessä suurimmasta testattavasta pitoisuudesta on vältettävä pitoisuuksia, jotka voivat aiheuttaa vääriä positiivisia vasteita, kuten liian voimakasta sytotoksisuutta, saostumista väliaineeseen tai pH-arvon tai osmolaliteetin merkittävää muuttumista (39) (40) (41).

23. Solujen proliferaation mittauksella varmistetaan, että käsitellyissä soluissa on tapahtunut mitoosi määritysmenettelyn aikana ja että käsittelyissä on käytetty asianmukaisia sytotoksisuustasoja (katso 29 kohta). Sytotoksisuus on määritettävä metabolisen aktivaation avulla ja ilman sitä soluissa, joissa metabolinen aktivaatio on tarpeen, tarkastelemalla solumäärän suhteellista lisääntymistä tai populaation suhteellista kaksinkertaistumista (katso kaavat lisäyksessä 2), paitsi jos käytetään sytoB:tä. Jos sytoB:tä käytetään, sytotoksisuus voidaan määrittää käyttämällä replikaatioindeksiä (RI) (katso kaava lisäyksessä 2).

24. Kun viljelmät käsitellään sytoB:llä ja viljelmän yksitumaisten, kaksitumaisten ja monitumaisten solujen suhteellinen osuus määritetään, käsittelyn täsmällinen vaikutus solujen proliferaatioon ja solun sytotoksiseen tai sytostaattiseen toimintaan voidaan määrittää kvantitatiivisesti (5). Lisäksi varmistetaan, että laskennassa huomioon otetaan vain solut, jotka ovat jakautuneet käsittelyn aikana tai sen jälkeen.

25. SytoB:llä tehtävissä tutkimuksissa sytostaasi/sytotoksisuus voidaan kvantifioida sytokineesin eston jälkeisestä proliferaatioindeksistä (5) (26) (56) tai se voidaan johtaa RI:stä, joka on määritetty vähintään 500 solulle viljelmää kohti (katso kaavat lisäyksessä 2). Kun solujen proliferaatiota arvioidaan sytoB:n avulla, sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI on määritettävä tarkastelemalla vähintään 500:aa solua viljelmää kohti. Sytotoksisuus voidaan arvioida muun muassa näiden tulosten avulla vertailemalla käsiteltyjen viljelmien ja kontrolliviljelmien arvoja. Myös muiden sytotoksisuuden merkkien (esimerkiksi konfluenttisuuden, solujen määrän, apoptoosin, nekroosin ja metafaasien määrän) arvioinnilla voidaan saada hyödyllistä tietoa.

26. Ilman sytoB:tä tehtävissä tutkimuksissa on osoitettava, että viljelmässä lasketut solut ovat jakautuneet testiaineella käsittelyn aikana tai sen jälkeen. Muussa tapauksessa tutkimuksesta voidaan saada vääriä negatiivisia tuloksia. Menetelmiä, joilla varmistetaan, että jakautuneet solut tulevat lasketuiksi, ovat muun muassa bromodeoksiuridiinin (BrdU) inkorporoituminen ja sen osoittaminen myöhemmin jakautuneiden solujen tunnistamiseksi (57), kloonien muodostuminen, kun pysyvien solulinjojen soluja käsitellään ja lasketaan *in situ* mikroskooppilevyllä (proliferaatioindeksi (PI)) (25) (26) (27) (28), tai populaation suhteellisen kaksinkertaistumisen tai solumäärän suhteellisen lisääntymisen määrittäminen tai muu soveltuvaksi osoitettu menetelmä (16) (56) (58) (59) (katso kaavat lisäyksessä 2). Myös muiden sytotoksisuuden tai sytostaasin merkkien (esimerkiksi konfluenttisuuden, solujen määrän, apoptoosin, nekroosin ja metafaasien määrän) arvioinnilla voidaan saada hyödyllistä tietoa.

27. Vähintään kolmea analysoitavissa olevaa testipitoisuutta on arvioitava. Jotta tämä olisi mahdollista, kokeessa voidaan käyttää useampia, toisistaan vain hieman poikkeavia pitoisuuksia. Mikrotumien muodostuminen voidaan arvioida niissä pitoisuuksissa, joiden sytotoksisuus on asianmukaisella vaihteluvälillä. Vaihtoehtoisesti voidaan suorittaa alustava sytotoksisuustesti, jolla rajataan lopullisen testin vaihteluväliä.

28. Suurimmassa pitoisuudessa sytotoksisuuden on oltava 55 ± 5 %. Sitä korkeammilla tasoilla kromosomit voivat vaurioitua sytotoksisuuden sekundaarivaikutuksena (60). Jos sytotoksisuutta esiintyy, valittujen testipitoisuuksien on katettava vaihteluväli 55 ± 5 prosentin sytotoksisuudesta vähäiseen sytotoksisuuteen tai tasoon, jolla sytotoksisuutta ei esiinny lainkaan.

▼M3

29. Jos sytotoksisuutta tai saostumista ei esiinny, suurimman testipitoisuuden on vastattava tasoa 0,01 M, 5 mg/ml tai 5 µl/ml sen mukaan, mikä pitoisuuksista on pienin. Analysoitavaksi valittujen pitoisuuksien on pääsääntöisesti erottava toisistaan enintään 10-kertaisesti. Jos testiaineen pitoisuus-vastekäyrä on jyrkkä, testiaineiden pitoisuudet voivat tarvittaessa olla lähempänä toisiaan, jotta myös keskitason ja vähäisen toksisuustason viljelmät pisteytetään.

30. Jos liukoisuus on rajoittava tekijä, suurimman pitoisuuden – jos sitä ei ole rajoitettu sytotoksisuuden takia – on oltava se pienin pitoisuus, jossa viljelmissä esiintyy mahdollisimman vähäistä saostumista; saostuminen ei kuitenkaan saa vaikuttaa laskemiseen. Saostumisen arvioinnissa on käytettävä esimerkiksi valomikroskooppia, jotta voidaan havaita viljelyn aikana esiintyvä tai (käsittelyn loppuun mennessä) muodostuva saostuma.

Kontrollit

31. Jokaisessa kokeessa on käytettävä samanaikaisia positiivisia kontrolleja ja liuotin-/kantaja-ainekontrolleja metabolisen aktivaation läsnä ollessa ja ilman sitä.

32. Positiivisia kontrolliaineita tarvitaan, jotta voidaan osoittaa käytettyjen solujen – ja testisuunnitelman – kyky tunnistaa klastogeenejä ja aneugeenejä sekä vahvistaa S9-preparaatin metabolointikyky. Positiivisina kontrollikemikaaleina on käytettävä tunnettuja mikrotumien indusoijia pitoisuuksina, joiden voidaan odottaa aiheuttavan vähäisen mutta toistettavissa olevan lisääntymisen taustaan verrattuna ja osoittaa koejärjestelmän herkkyyden. Positiivisen kontrollikemikaalin pitoisuudet on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä.

33. Soluviljelmän metabolointikyky ja klastogeenien osoituskyky on osoitettava käyttämällä metabolista aktivaatiota edellyttävää klastogeenia (esimerkiksi syklofosfamidi tai bentso[a]pyreeni). Muita positiivisia kontrollikemikaaleja voidaan käyttää, jos käyttö perustellaan. Koska tietyt metabolista aktivaatiota edellyttävät positiiviset kontrollikemikaalit voivat tietyissä käsittelyolosuhteissa tai tietyissä solulinjoissa aktivoitua ilman eksogeenista metabolista aktivaatiota, metabolisen aktivaation tarve ja S9-preparaatin toiminta on testattava valitussa solulinjassa ja valituissa pitoisuuksissa.

34. Tähän mennessä ei ole havaittu, että yhdenkään aneugeenin genotoksinen toiminta edellyttäisi metabolista aktivaatiota (16). Nykyisin aneugeenisen toiminnan hyväksyttyjä positiivisia kontrollikemikaaleja ovat esimerkiksi kolkisiini ja vinblastiini. Myös muiden kemikaalien käyttö on sallittu, jos ne indusoivat mikrotumia yksinomaan tai pääasiassa aneugeenisen toiminnan välityksellä. Jotta ei tarvittaisi kahta positiivista kontrollikemikaalia erikseen klastogeenisuutta ja aneugeenisuutta varten (ilman metabolista aktivaatiota), aneugeenisuuden kontrollikemikaalia voidaan käyttää positiivisena kontrollikemikaalina ilman S9-jaetta ja käytetyn metabolisen aktivaatiojärjestelmän riittävyys voidaan testata klastogeenisuuden kontrollikemikaalilla. Sekä klastogeenisuuden että aneugeenisuuden positiivista kontrollikemikaalia on käytettävä soluissa, joissa ei tarvita S9-jaetta. Ehdotetut positiiviset kontrollikemikaalit esitetään lisäyksessä 3.

35. Samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvan positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä voidaan harkita, mikäli sopivia kemikaaleja on saatavilla. Positiivisia kontrollikemikaaleja on käytettävä vain, jos ne soveltuvat kyseiselle solutyypille ja kyseisiin aktivaatio-olosuhteisiin.

▼M3

36. Solujen jokaisena keräämisajankohtana on otettava näytteet myös liuottimella/kantaja-aineella käsitellyistä kontrolleista. Lisäksi on käytettävä myös käsittelemättömiä negatiivisia kontrolleja (ei liuotinta/kantaja-ainetta), paitsi jos julkaistut tai laboratorion aikaisemmat tiedot kontrollista osoittavat, ettei valitulla liuottimella ole käytetyissä pitoisuuksissa genotoksisia tai muita haitallisia vaikutuksia.

TESTIMENETTELY

Käsittelyaikataulu

37. Jotta aneugeenin tai klastogeenin toiminta tietyssä solusyklin vaiheessa voidaan mahdollisimman todennäköisesti osoittaa, on tärkeää, että testiaineella käsitellään riittävä määrä soluja niiden kaikissa solusyklin vaiheissa. Solulinjojen ja primääristen soluviljelmien käsittelyaikataulu voi näin ollen poiketa jonkin verran lymfosyyttien käsittelyaikataulusta, sillä niiden solusyklin käynnistyminen edellyttää mitogeenista stimulaatiota. Niitä tarkastellaan 41–43 kohdassa (16).

38. Teorian ja julkaistujen tietojen perusteella (18) useimmat aneugeenit ja klastogeenit voidaan osoittaa S9-jakeen kanssa ja ilman S9-jaetta toteutettavalla 3–6 tuntia kestävällä lyhyellä käsittelyjaksolla, jonka jälkeen testiaine poistetaan ja viljelmän annetaan kasvaa 1,5–2,0 solusyklin ajan (6). Solut kerätään noin 1,5–2,0 normaalin (eli käsittelemättömän) solusyklin kuluttua joko käsittelyn aloittamisen jälkeen tai sen lopussa (katso taulukko 1). Näytteenotto- tai palautumisaikoja voidaan pidentää, jos tiedetään tai oletetaan, että testiaine vaikuttaa solusyklin kestoon (esimerkiksi kun testataan nukleosidianalogeja).

39. Koska S9-preparaatiot voivat olla toksisia viljellyille nisäkässoluille, pidennettyä 1,5–2,0 normaalin solusyklin altistusta käytetään vain ilman S9-jaetta. Pidennetyssä käsittelyssä soluja voidaan käsitellä testikemikaalilla joko sytoB:n kanssa tai ilman sitä. Näin voidaan ottaa huomioon testiaineen ja sytoB:n mahdollinen vuorovaikutus.

40. Solujen ehdotetut käsittelyaikataulut esitetään taulukossa 1. Näitä yleisiä käsittelyaikatauluja voidaan mukauttaa testiaineen stabiiliuden tai reaktiivisuuden tai käytettävien solujen erityisten kasvuominaisuuksien mukaisesti. Kaikki käsittelyt on käynnistettävä ja saatava päätökseen, kun solut kasvavat eksponentiaalisesti. Aikataulut esitellään yksityiskohtaisemmin jäljempänä olevissa 41–47 kohdassa.

Taulukko 1

Solujen käsittely- ja keräämisajankohdat MNvit-määritysmenetelmässä

Lymfosyytit, primaarisolut ja solulinjat, jotka on käsitelty sytoB:llä	+ S9	Käsitellään 3–6 tuntia S9:n kanssa; poistetaan S9 ja käsittelyväliaine; lisätään uusi väliaine ja sytoB; kerätään 1,5–2,0 normaalia solusykliä myöhemmin.
	– S9 Lyhyt altistus	Käsitellään 3–6 tuntia; poistetaan käsittelyväliaine; lisätään uusi väliaine ja sytoB; kerätään 1,5–2,0 normaalia solusykliä myöhemmin.

▼M3

	– S9 Pidennetty altistus	*Vaihtoehto A:* Käsitellään 1,5–2 normaalin solusyklin ajan sytoB:n kanssa; kerätään altistusjakson päättyessä. *Vaihtoehto B:* Käsitellään 1,5–2,0 normaalin solusyklin ajan; poistetaan testiaine; lisätään uusi väliaine ja sytoB; kerätään 1,5–2,0 normaalia solusykliä myöhemmin.
Solulinjat, joita ei ole käsitelty sytoB:n kanssa (Samat käsittelyaikataulut, mutta sytoB:tä ei lisätä)		

Lymfosyytit, primaarisolut ja solulinjat sytoB:n kanssa

41. Tehokkain menetelmä lymfosyyteille on aloittaa testiaineelle altistaminen 44–48 tunnin kuluttua PHA-stimulaatiosta, kun syklin synkronoitumista ei enää havaita (5). Solut käsitellään ensin testiaineella 3–6 tunnin ajan sekä S9:n läsnä ollessa että ilman sitä. Käsittelyväliaine poistetaan ja lisätään uutta väliainetta, joka sisältää sytoB:tä, ja solut kerätään 1,5–2,0 normaalia solusykliä myöhemmin.

42. Jos näistä lyhyistä (3–6 tunnin) käsittelyistä saadaan negatiiviset tai epäselvät tulokset, soluja altistetaan uudelleen kauemmin kestävälle käsittelylle ilman S9:ää. On olemassa kaksi yhtä hyvää käsittelyvaihtoehtoa. Stimuloiduille lymfosyyteille voi kuitenkin olla parempi käyttää vaihtoehtoa A, joilla eksponentiaalinen kasvu voi hidastua 96 tunnin kuluttua stimulaatiosta. Soluviljelmät eivät myöskään saa olla konfluentteja vaihtoehdon B viimeiseen näytteenottoajankohtaan mennessä.

— Vaihtoehto A: Soluja käsitellään testiaineella 1,5–2,0 normaalin solusyklin ajan, ja ne kerätään käsittelyjakson päättyessä.

— Vaihtoehto B: Soluja käsitellään testiaineella 1,5–2,0 normaalin solusyklin ajan. Käsittelyväliaine poistetaan ja korvataan uudella väliaineella, ja solut kerätään seuraavan 1,5–2,0 normaalin solusyklin jälkeen.

43. Primaarisoluja ja solulinjoja on käsiteltävä samalla tavalla kuin lymfosyyttejä, mutta niitä ei tarvitse stimuloida PHA:lla 44–48 tunnin ajan. Kun kyseessä ovat muut solut kuin lymfosyytit, niitä on altistettava niin, että tutkimuksen päättymisajankohtana solut ovat edelleen kasvun logaritmisessa vaiheessa.

Solulinjat ilman sytoB:tä

44. Soluja on käsiteltävä 3–6 tunnin ajan S9:n läsnä ollessa ja ilman sitä. Käsittelyväliaine poistetaan ja korvataan uudella väliaineella, ja solut kerätään 1,5–2,0 normaalia solusykliä myöhemmin.

▼M3

45. Jos molemmista lyhyistä (3–6 tunnin) käsittelyistä saadaan negatiiviset tai epäselvät tulokset, soluja altistetaan uudelleen pidennetylle käsittelylle (ilman S9:ää). Käytettävissä on kaksi yhtä hyvää käsittelyvaihtoehtoa:

— Vaihtoehto A: Soluja käsitellään testiaineella 1,5–2,0 normaalin solusyklin ajan, ja ne kerätään käsittelyjakson päättyessä.

— Vaihtoehto B: Soluja käsitellään testiaineella 1,5–2,0 normaalin solusyklin ajan. Käsittelyväliaine poistetaan ja korvataan uudella väliaineella, ja solut kerätään seuraavan 1,5–2,0 normaalin solusyklin jälkeen.

46. Yhden solun vahvuisissa kerroksissa voi esiintyä mitoosissa olevia soluja (pyöreitä, irtoavat pinnasta) 3–6 tuntia kestävän käsittelyn päättyessä. Koska mitoosissa olevat solut irtoavat helposti, ne voivat hävitä väliaineen mukana, kun se kaadetaan pois. Nämä solut on kerättävä huolellisesti viljelmien huuhtelun yhteydessä ja palautettava viljelmiin, jotta mitoosivaiheessa olevia soluja, joissa mikrotumia voi muodostua, ei menetetä keruuvaiheessa.

Viljelmien määrä

47. Testiaineen jokaista pitoisuutta sekä kantaja-aine-/liuotinkontrollia ja negatiivista kontrollia varten on käytettävä kaksi rinnakkaisviljelmää. Mikäli laboratorion aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että rinnakkaisviljelmien välillä on vain hyvin vähäisiä eroja, yhden viljelmän käyttö voi olla hyväksyttävää. Yhtä viljelmää käytettäessä suositellaan, että pitoisuuksia analysoidaan tavallista suurempi määrä.

Solujen kerääminen ja objektilasien preparointi

48. Jokainen viljelmä kerätään ja käsitellään erikseen. Solujen preparointiin voidaan käyttää hypotonista käsittelyä, mutta tämä vaihe ei ole tarpeen, jos solut levittäytyvät lasille riittävästi. Objektilasien preparoinnissa voidaan käyttää erilaisia tekniikoita edellyttäen, että pisteytystä varten saadaan korkealaatuisia solupreparaatteja. Solulima on säilytettävä mikrotumien osoittamista ja (sytokineesin estämiseen perustuvassa menetelmässä) kaksitumaisten solujen luotettavaa tunnistamista varten.

49. Objektilasit voidaan värjätä erilaisilla menetelmillä, kuten Giemsa-menetelmällä tai fluorisoivilla DNA-spesifisillä väriaineilla (59). DNA-spesifisen väriaineen (esimerkiksi akridiinioranssin (61) tai Hoechst 33258:n plus pyroniini-Y:n (62)) käytöllä voidaan eliminoida joitakin ei-DNA-spesifisen väriaineen käyttöön liittyviä artefakteja. Mikrotumien sisällön (kromosomin/kromosomifragmentin) selvittämisessä voidaan käyttää anti-kinetokorivasta-aineita, FISH-tekniikkaa yhdessä pansentromeeri-DNA-koettimien kanssa tai *in situ* -merkkausta pansentromeerispesifisillä alukkeilla yhdessä sopivan DNA:n vastavärjäyksen kanssa, jos mikrotumien muodostumisesta halutaan saada mekanistista tietoa (15) (16). Muita klastogeenien ja aneugeenien erottelumenetelmiä voidaan käyttää, jos menetelmät on osoitettu tehokkaiksi.

Analyysi

50. Kaikki objektilasit, myös positiivisia ja negatiivisia kontrolleja sisältävät, on koodattava ennen mikroskooppitutkimusta. Koodattuja näytteitä voidaan analysoida myös validoidulla, automaattisella virtaussytometria- tai kuva-analyysijärjestelmällä.

▼M3

51. SytoB-käsiteltyjen viljelmien mikrotumien määrä on analysoitava vähintään 2 000 kaksitumaisessa solussa kutakin pitoisuutta kohti (vähintään 1 000 kaksitumaista solua viljelmää kohti; kaksi viljelmää pitoisuutta kohti). Jos käytetään yhtä erillistä viljelmää, viljelmästä on laskettava vähintään 2 000 kaksitumaista solua pitoisuutta kohti. Jos kussakin pitoisuudessa laskettavissa on huomattavasti vähemmän kuin 1 000 kaksitumaista solua viljelmää kohti (tai 2 000 solua, jos käytetään yhtä viljelmää) ja jos mikrotumien määrä ei havaintojen mukaan ole kasvanut merkittävästi, testi on toistettava useammilla soluilla tai vähätoksisemmilla pitoisuuksilla sen mukaisesti, kumpi vaihtoehto soveltuu tarkoitukseen paremmin. On varmistettava, että muodoltaan epäsäännöllisiä kaksitumaisia soluja tai soluja, joiden kaksi tumaa poikkeaa kooltaan huomattavasti toisistaan, ei lasketa; kaksitumaisia soluja ei myöskään saa sekoittaa huonosti levittyneisiin monitumaisiin soluihin. Useampia kuin kaksi päätumaa sisältävistä soluista ei pitäisi analysoida mikrotumia, koska mikrotumien määrä voi olla tällaisissa soluissa suurempi (63) (64). Yksitumaisten solujen laskeminen hyväksytään, jos testiaineen on osoitettu häiritsevän sytoB:n aktiivisuutta.

52. Solulinjoissa, joilla tehdään määritys ilman sytoB-käsittelyä, mikrotumat olisi pisteytettävä vähintään 2 000 solussa pitoisuutta kohti (vähintään 1 000 solua viljelmää kohti; kaksi viljelmää pitoisuutta kohti). Jos yhtä pitoisuutta kohti käytetään vain yhtä viljelmää, kyseisestä viljelmästä on laskettava vähintään 2 000 solua.

53. Kun sytoB:tä käytetään, sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI on määritettävä solujen proliferaation arvioimiseksi (katso lisäys 2) käyttämällä vähintään 500:aa solua viljelmää kohti. Kun käsittely tehdään ilman sytoB:tä, on tärkeää esittää todisteet siitä, että laskettavat solut ovat proliferoituneet (ks. 24–27 kohta).

Hyväksyttävyysperusteet

54. Tässä kuvatun MNvit-määritysmenetelmän käyttöä ehdottavan laboratorion on osoitettava valmiutensa osoittaa luotettavasti ja täsmällisesti kemikaalit, jotka tunnetusti toimivat aneugeenisesti ja klastogeenisesti metabolisen aktivaation läsnä ollessa ja ilman sitä, sekä tunnetut negatiiviset kemikaalit. Tässä on käytettävä lisäyksessä 3 lueteltuja vertailukemikaaleja. Laboratorio voi osoittaa valmiutensa käyttää tätä testimenetelmää asianmukaisesti esittämällä todisteet siitä, että mikrotumien muodostumisen pisteytykseen käytetyissä soluissa on tapahtunut yksi tuman jakautuminen, jos testi tehdään ilman sytoB:tä.

55. Vertailukemikaaleina käytettäväksi suositellaan lisäyksessä 3 lueteltuja kemikaaleja. Korvaavia tai täydentäviä kemikaaleja voidaan käyttää, jos niiden vaikutus tunnetaan, jos ne indusoivat mikrotumia samoilla toimintamekanismeilla ja jos ne on osoitettu merkityksellisiksi MNvit-menetelmällä testattavien kemikaalien suhteen. Perusteluna voidaan esittää muun muassa validointitutkimusta, jossa testiaineen kemikaaliluokan tai tutkittavan vauriomekanismin perusteella on käytetty useita eri aineita tai vähäisempää ainemäärää.

56. Liuotin-/kantaja-ainekontrollien ja käsittelemättömien viljelmien olisi annettava tulokseksi toistettavasti vähäinen ja yhdenmukainen mikrotumien määrä (yleensä 5–25 mikrotumaa tuhatta solua kohti 11 kohdassa mainittujen solutyyppien osalta). Muiden solutyyppien tuotosten vaihteluvälit voivat olla erilaisia, ja ne on määritettävä, kun solutyyppejä validoidaan MNvit-määritysmenetelmässä käyttämistä varten. Kontrollien vaihteluvälit on määritettävä pitkältä ajalta negatiivisista kontrolleista, liuotinkontrolleista ja positiivisista kontrolleista saatujen tietojen perusteella. Näitä arvoja olisi käytettävä arvioitaessa, ovatko samanaikaiset negatiiviset tai positiiviset kontrollit asianmukaisia.

▼M3

57. Jos määritysmenetelmän tutkimussuunnitelmaan ehdotetaan pieniä muutoksia (esimerkiksi automaattisten pisteytystekniikoiden käyttämistä manuaalisten laskentatekniikoiden asemesta tai uuden solutyypin käyttämistä), muutoksen vaikutus on osoitettava, ennen kuin tutkimussuunnitelman muutos voidaan hyväksyä. Vaikutuksen osoittamisella tarkoitetaan, että on muun muassa osoitettava, että kromosomin katkeamisen, liittymän tai häviämän tärkeimmät mekanismit voidaan osoittaa ja että testattavan yksittäisen aineen luokalle tai monille erilaisille aineille voidaan saada asianmukaiset positiiviset ja negatiiviset tulokset.

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Tulosten käsittely

58. Jos käytetään sytokineesin inhibiittoritekniikkaa, mikrotumien indusoitumisen arvioinnissa käytetään vain sellaisia kaksitumaisia soluja, joissa esiintyy mikrotumia (riippumatta mikrotumien määrästä solua kohti). Yksi, kaksi tai monta mikrotumaa omaavien solujen määrän laskemisella voidaan saada hyödyllistä tietoa, mutta se ei ole pakollista.

59. Kaikille käsitellyille viljelmille ja liuotin-/kantajakontrolleille olisi tehtävä samanaikaisesti sytotoksisuus- ja/tai sytostaasimääritykset (58). Sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI on laskettava kaikille käsitellyille viljelmille ja kontrolliviljelmille määrittämällä solusyklin viivästyminen, kun käytetään sytokineesin estomenetelmää. Jos sytoB:tä ei käytetä, on määritettävä populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen, solumäärän suhteellisen lisääntyminen tai PI (katso lisäys 2).

60. Kustakin viljelmästä on esitettävä tiedot erikseen. Kaikista tiedoista on lisäksi esitettävä yhteenveto taulukkomuodossa.

61. MNvit-määritysmenetelmässä kemikaalit voivat aiheuttaa mikrotumien muodostumista indusoimalla kromosomien katkeamista, niiden häviämistä tai molempia. Antikinetokorivasta-aineilla, sentromeerispesifisillä *in situ* -koettimilla tai muilla menetelmillä voidaan yrittää määrittää, johtuuko mikrotumien indusoitumismekanismi klastogeenisesta ja/tai aneugeenisesta vaikutuksesta.

Tulosten arviointi ja tulkinta

62. Selviä positiivisia tai negatiivisia tuloksia ei tarvitse vahvistaa täydentävillä testeillä. Epäselviä tuloksia voidaan selventää analysoimalla vielä tuhat solua kaikista viljelmistä, jotta vältetään satunnaisuuden vääristyminen. Jos tulosta ei saada selville tällä tavalla, viljelmille on tehtävä uusia testejä. Niissä olisi harkittava tutkimusparametrien muuttamista tapauksesta riippuen laajemmin tai suppeammin. Tutkimusparametreja, joita voitaisiin muuttaa, ovat muun muassa testipitoisuuksien erot, viljelmien käsittelyajankohta ja solujen keräämisajankohta ja/tai metabolisen aktivaation olosuhteet.

63. Positiivinen tulos voidaan päätellä useiden perusteiden avulla. Näitä ovat esimerkiksi mikrotumallisten solujen määrän pitoisuuteen sidottu kasvu tai tilastollisesti merkittävä kasvu. Aluksi on tarkasteltava tulosten biologista merkityksellisyyttä. Sen arvioimiseksi voidaan tarkastella sitä, ovatko havaitut arvot aiemman kontrollivaihteluvälin sisällä vai sen ulkopuolella. Testitulosten arvioinnissa voidaan käyttää asianmukaisia tilastollisia menetelmiä (65). Tilastollisen testauksen tuloksia on kuitenkin arvioitava suhteessa annos-vastesuhteeseen. Myös uusittavuus ja aiemmat tulokset on otettava huomioon.

▼M3

64. Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin tapauksissa mittaustulosten pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä testiaineen aktiivisuudesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

65. MNvit-määritysmenetelmässä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että testiaine indusoi kromosomien katkeamista tai häviämää viljellyissä nisäkässoluissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, että testiaine ei käytetyissä testiolosuhteissa indusoi kromosomien katkeamista ja/tai liittymää tai häviämää viljellyissä nisäkässoluissa.

Testiraportti

66. Testiraportissa on annettava vähintään seuraavat tiedot, jos ne ovat merkityksellisiä tutkimuksen suorituksen kannalta:

Testikemikaali

— tunnistetiedot sekä CAS-numero ja EC-numero

— fysikaalinen olomuoto ja puhtaus

— tutkimuksen tekemisen kannalta merkitykselliset fysikaaliskemialliset ominaisuudet

— testikemikaalin reagointi liuottimen/kantaja-aineen tai solujen kasvatusväliaineen kanssa

Liuotin/kantaja-aine

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet

— testiaineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa

Solut

— käytettyjen solujen tyyppi ja alkuperä

— käytetyn solutyypin soveltuvuus

— mahdollinen mykoplasmakontaminaatio

— tiedot solusyklin kestosta, jakautumisaika tai proliferaatioindeksi

— lymfosyyttien osalta verenluovuttajien sukupuoli, ikä ja tarvittaessa määrä

— lymfosyyttien osalta tieto siitä, onko testissä altistettu kokoverta vai eristettyjä lymfosyyttejä

— tarvittaessa siirrostusten lukumäärä

— tarvittaessa soluviljelymenetelmät

— kromosomien modaalinen lukumäärä

— tavallinen (negatiivisen kontrollin) solusyklin kesto

Testiolosuhteet

— mahdollinen sytokineesin inhibiittori (esimerkiksi sytoB), sen pitoisuus ja solujen altistuksen kesto

— pitoisuuksien ja soluviljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esimerkiksi sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset, mikäli tiedot ovat käytettävissä

— väliaineen koostumus ja tarvittaessa CO_2-pitoisuus

— testiaineen pitoisuudet

▼M3

— lisätyn kantaja-aineen ja testiaineen pitoisuus (ja/tai tilavuus)

— inkubaatiolämpötila ja -aika

— käsittelyn kesto

— käsittelyn jälkeinen keräämisajankohta

— tarvittaessa solutiheys inokuloitaessa

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus, myös sen hyväksyttävyysperusteet

— positiiviset kontrollikemikaalit ja negatiiviset kontrollit

— objektilasien preparointimenetelmät ja käytetyt värjäystekniikat

— mikrotumien tunnistusperusteet

— analysoitujen solujen määrät

— sytotoksisuuden mittausmenetelmät

— muut sytotoksisuuteen liittyvät tiedot

— tutkimusten positiivisuuden, negatiivisuuden tai epäselvyyden arviointiperusteet

— käytetyt tilastoanalyysimenetelmät

— tarvittaessa menetelmät sen määrittämiseksi, sisältävätkö mikrotumat kokonaisia kromosomeja vai kromosomifragmentteja, esimerkiksi kinetokorivasta-aineen käyttö

Tulokset

— käytetyt sytotoksisuuden määritysmenetelmät, esimerkiksi sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI (sytokineesin estoon perustuva menetelmä); solumäärän suhteellinen lisääntyminen, populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen tai PI (muu kuin sytokineesin estoon perustuva menetelmä); tarvittaessa muut havainnot, esimerkiksi solujen konfluenssi, apoptoosi, nekroosi, metafaasien määrä ja kaksitumaisten solujen määrä

— saostumisen merkit

— tiedot käsittelyväliaineen pH:sta ja osmolaliteetista, jos määritetty

— analysoitavaksi hyväksyttävien solujen määritelmä

— yksi-, kaksi- ja monitumaisten solujen osuudet, jos sytokineesin estoon perustuvaa menetelmää on käytetty

— mikrotumallisten solujen määrä kussakin käsitellyssä viljelmässä ja kontrolliviljelmässä ja tiedot solujen mahdollisesta kaksitumaisuudesta tai monitumaisuudesta

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

— samanaikaisten negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisten kontrollikemikaalien tiedot (pitoisuudet ja liuottimet)

— aikaisemmat tiedot negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrollikemikaaleista, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat sekä luottamusväli (esimerkiksi 95 prosenttia)

— tilastoanalyysi; mahdolliset p-arvot

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

▼**M3**

LÄHDELUETTELO

(1) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.* 392, s. 1–4.

(2) Parry, J. M. ja Sors, A. (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Res.* 287, s. 3–15.

(3) Fenech, M. ja Morley, A. A. (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios.* 43, s. 233–246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. ja Wakata, A. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environ. Mol. Mutagen*. 35, s. 167–172.

(5) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols 2* (5), s. 1084–1104.

(6) Fenech, M. ja Morley, A. A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Res.* 161, s. 193–198.

(7) Eastmond, D. A. ja Tucker, J. D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 13, s. 34–43.

(8) Eastmond, D. A. ja Pinkel, D. (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes. *Mutation Res.* 234, s. 9–20.

(9) Miller, B. M., Zitzelsberger, H. F., Weier, H. U. ja Adler, I. D. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis* 6, s. 297–302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F. ja Natarajan, A. T. (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis* 8, s. 329–334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. ja Lo Jacono, F. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Res.* 319, s. 205–213.

(12) Norppa, H., Renzi, L. ja Lindholm, C. (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis* 8, s. 519–525.

(13) Eastmond, D. A, Rupa, D. S. ja Hasegawa, L. S. (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Res.* 322, s. 9–20.

(14) Marshall, R. R., Murphy, M., Kirkland, D. J. ja Bentley, K. S. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Res.* 372, s. 233–245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. ja Crebelli, R. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Res.* 372, s. 211–219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. ja Wakata, A. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.* 540, s. 153–163.

▼M3

(17) OECD (1997). *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa www.oecd.org/env/testguidelines

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M. J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. ja Marzin, D. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Res.* 607, s. 13–36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L. C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. ja Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Res.* 607, s. 37–60.

(20) Aardema, M. J., Snyder, R. D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R. J., Gibson, D. P., Soelter, S., Curry, P. T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. ja Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Res.* 607, s. 61–87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. ja Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Res.* 607, s. 88–124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. ja Lorge, E. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Res.* 607, s. 125–152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A. A. ja Locher, F. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Res.* 392, s. 187–208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. ja Lorge, E. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Res.* 392, s. 45–59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. ja Madle, S. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung. *Mutation Res.* 410, s. 81–116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. ja Madle, S. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Res.* 439, s. 183–190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S. Y., Kasper, P. ja Müller, L. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Res.* 445, s. 55–71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H. G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. ja Madle, S. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*. 468, s. 137–163.

(29) Garriott, M. L., Phelps, J. B. ja Hoffman, W. P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Res.* 517, s. 123–134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. ja Sofuni, T. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 14, s. 569–580.

▼M3

(31) Elhajouji, A. ja Lorge, E. (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Res.* 607, s. 1–152.

(32) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC:in 25. kokous, 16.–17. marraskuuta 2006. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.it/index.htm

(33) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.it/index.htm

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J. ja Vanparys P. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis* 23, s. 271–283.

(35) Zhang, L. S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. ja Sofuni, T. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Res.* 347, s. 105–115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. ja Knasmeuller, S. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis* 17, s. 257–260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W. W., Hoelzl, C., Bichler, J. ja Majer, B. J. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicol.* 198, s. 315–328.

(38) Gibson, D. P., Brauninger, R., Shaffi, H. S., Kerckaert, G. A., LeBoeuf, R. A., Isfort, R. J. ja Aardema, M. J. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Res.* 392, s. 61–70.

(39) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. ja Myhr, B. C. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.* 257, s. 147–205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. ja Okumura, K. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Res.* 268, s. 297–305.

(41) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environ. Mutagen*. 8, s. 789–886.

(42) Fenech, M. ja Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.* 147, s. 29–36.

(43) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Res.* 392, s. 11–18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y. P., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hrelia, P., Krishnaja, A. P., Lee, T. K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W. U., Odagiri, Y., Scarffi, M. R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. ja Zijno, A. (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* 37, s. 31–45.

▼M3

(45) Maron, D. M. ja Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* 113, s. 173–215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C. R. ja Zeiger, E. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 4, s. 55–65.

(47) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. ja Wolf, R. C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis* 7, s. 175–177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. ja Sugimura, T. (1976). A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *teoksessa:* de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. ja Philpot, R. M. (ed.), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

(49) Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R. ja Galloway, S. M. (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environ. Mol. Mutagen.* 28, s. 51–59.

(50) UNEP (2001). Pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskeva Tukholman yleissopimus. Yhdistyneiden kansakuntien ympäristöohjelma (UNEP). Saatavilla osoitteessa http://www.pops.int/

(51) Doherty, A. T., Ellard, S., Parry, E. M. ja Parry, J. M. (1996). An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells. *Mutagenesis* 11, s. 247–274.

(52) Krahn, D. F., Barsky, F. C. ja McCooey, K. T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *teoksessa:* Tice, R. R., Costa, D. L. ja Schaich, K. M. (ed.), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, s. 91–103.

(53) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. ja Brooks, A. L. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environ. Mutagenesis* 5, s. 795–801.

(54) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Res.* 285, s. 35–44.

(55) Phelps, J. B., Garriott, M. L. ja Hoffman, W. P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Res.* 521, s. 103–112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. ja Wakata, A. (2004). Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group". *Mutation Res.* 564, s. 97–100.

(57) Pincu, M., Bass, D. ja Norman, A. (1984). An improved micronuclear assay in lymphocytes. *Mutation Res.* 139, s. 61–65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. ja Kirkland, D. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Res.* 655, s. 1–3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. ja Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 341, s. 169–184.

(60) Galloway, S. (2000). Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, s. 191–201.

▼**M3**

(61) Hayashi, M., Sofuni, T. ja Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.* 120, s. 241–247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. ja Langlois, R. G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Res.* 120, s. 269–275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. ja Ishidate, M. Jr. (1983). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Res.* 120, s. 241–247.

(64) Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. ja Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 534, s. 65–75.

(65) Hoffman, W. P., Garriott, M. L. ja Lee, C. (2003). *In vitro* micronucleus test, *teoksessa:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, 2. painos. S. Chow (toim.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, s. 463–467.

(66) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 850/2004, annettu 29 päivänä huhtikuuta 2004, pysyvistä orgaanisista yhdisteistä sekä direktiivin 79/117/ETY muuttamisesta. EUVL L 229, 30.4.2004, s. 5.

▼M3

Lisäys 1

Määritelmät

Aneugeeni: aine tai prosessi, joka vuorovaikutuksessa solun mitoottisen ja meioottisen jakautumissyklin vaiheiden kanssa johtaa solujen tai organismien aneuploidiaan.

Aneuploidia: yksittäisen tai useamman kuin yhden kromosomin mutta ei kuitenkaan koko kromosomiston (polyploidia) poikkeaminen kromosomien tavallisesta diploidisesta (tai haploidisesta) määrästä.

Apoptoosi: ohjelmoitunut solukuolema, jossa tietyt vaiheet johtavat solujen hajoamiseen solukalvon ympäröimiksi rakkuloiksi, jotka myöhemmin häviävät fagosytoosin tai puhkeamisen seurauksena.

Solujen proliferaatio: solujen määrän kasvaminen solujen mitoottisen jakautumisen seurauksena.

Sentromeeri: kromosomin DNA:n alue, jossa kromatidit liittyvät yhteen ja johon molemmat kinetokorit kiinnittyvät rinnakkain.

Klastogeeni: aine tai prosessi, joka aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia solu- tai organismipopulaatioissa.

Sytokineesi: solun jakautuminen välittömästi mitoosin jälkeen, jolloin muodostuu kaksi yksitumaista tytärsolua.

Sytokineesin eston proliferaatioindeksi: toisen jakautumisvaiheen solujen osuus käsitellyssä populaatiossa käsittelemättömään kontrollipopulaatioon verrattuna (katso kaava lisäyksessä 2).

Sytostaasi: solujen kasvun estäminen (katso kaava lisäyksessä 2).

Sytotoksisuus: solurakenteeseen kohdistuvat haitalliset vaikutukset tai toiminta, joka johtaa solukuolemaan.

Genotoksinen: yleinen nimitys kaikentyyppisille DNA- tai kromosomivaurioille, muun muassa katkeamiselle, adduktien uudelleenjärjestäytymiselle, mutaatioille, kromosomipoikkeavuuksille ja aneuploidialle. Kaikki genotoksiset vaikutukset eivät johda mutaatioihin tai pysyviin kromosomivaurioihin.

Interfaasisolut: solut, jotka eivät ole mitoosivaiheessa.

Kinetokori: proteiinia sisältävä rakenne, joka rakentuu kromosomin sentromeerin kohdalle, johon tumasukkulat kiinnittyvät solun jakautumisen aikana ja jonka ansiosta tytärkromosomit voivat liikkua kohti tytärsolujen napoja.

Mikrotumat: pienet tumat, jotka eivät ole solujen varsinaisia tumia vaan esiintyvät niiden lisäksi ja jotka muodostuvat hitaasti liikkuvista kromosomifragmenteista tai kokonaisista kromosomeista mitoosin tai meioosin telofaasin aikana.

Mitoosi: solutuman jakautuminen, joka jaotellaan yleensä profaasiin, prometafaasiin, metafaasiin, anafaasiin ja telofaasiin.

Mitoosi-indeksi: suhdeluku, joka saadaan jakamalla metafaasissa olevien solujen määrä solupopulaatiossa todettujen solujen kokonaismäärällä; ilmoittaa solujen proliferaatioasteen kyseisessä solupopulaatiossa.

Mutageeninen: aiheuttaa periytyvän muutoksen geenien DNA:n emäsparirakenteessa tai kromosomirakenteessa (kromosomipoikkeavuudet).

▼**M3**

Nondisjunktio: häiriö, jossa kromatidiparit eivät erkaannu toisistaan ja jakaudu oikein kehittyviin tytärsoluihin, minkä takia tytärsolujen kromosomimäärä poikkeaa tavallisesta.

Polyploidia: solujen tai organismien kromosomien lukumäärää koskeva poikkeavuus, joka koskee yksittäisen kromosomin tai kromosomien (aneuploidia) sijaan koko kromosomistoa.

Proliferaatioindeksi (PI): sytotoksisuuden mittausmenetelmä, kun sytoB:tä ei käytetä (katso kaava lisäyksessä 2).

Solumäärän suhteellinen lisääntyminen: sytotoksisuuden mittausmenetelmä, kun sytoB:tä ei käytetä (katso kaava lisäyksessä 2).

Populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen: sytotoksisuuden mittausmenetelmä, kun sytoB:tä ei käytetä (katso kaava lisäyksessä 2).

Replikaatioindeksi (RI): altistus- ja palautumisjakson aikana päättyneiden solunjakautumissyklien osuus käsitellyssä viljelmässä verrattuna käsittelemättömään kontrolliviljelmään (katso kaava lisäyksessä 2).

Testikemikaali (testiaine): aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

▼M3

Lisäys 2

Kaavat sytotoksisuuden määritystä varten

1. *Kun sytoB:tä käytetään*, sytotoksisuuden arvioinnin on perustuttava sytokineesin eston proliferaatioindeksiin (SEPI) tai replikaatioindeksiin (RI) (16) (58). Sytokineesin eston proliferaatioindeksi ilmaisee solusyklien keskimääräistä määrää solua kohti sytoB:lle altistamisen aikana, ja sitä voidaan käyttää solujen proliferaation laskemiseen. RI ilmaisee tumien suhteellista määrää käsitellyissä viljelmissä verrattuna kontrolliviljelmiin, ja sitä voidaan käyttää sytostaasiasteen (sytostaasi-%) laskemiseen seuraavasti:

$$\text{sytostaasi-\%} = 100 - 100\{(\text{SEPI}_T - 1) \div (\text{SEPI}_C - 1)\}$$

ja:

T = testikemikaalilla käsitelty viljelmä

C = kantaja-ainekontrolliviljelmä

jossa:

$$\text{SEPI} = \frac{((\text{yksitumaisten solujen määrä}) + (2 \times \text{kaksitumaisten solujen määrä}) + (3 \times \text{monitumaisten solujen määrä}))}{(\text{solujen yhteenlaskettu määrä})}$$

Näin ollen, jos SEPI = 1 (kaikki solut ovat yksitumaisia), sytostaasi on 100 %.

$$\text{Sytostaasi} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{kaksitumaisten solujen määrä}) + (2 \times \text{monitumaisten solujen määrä})) \div (\text{solujen yhteenlaskettu määrä})_T}{((\text{kaksitumaisten solujen määrä}) + (2 \times \text{monitumaisten solujen määrä})) \div (\text{solujen yhteenlaskettu määrä})_C} \times 100$$

T = käsitellyt viljelmät

C = kontrolliviljelmät

2. Näin ollen, jos RI = 53 %, kontrolliviljelmässä kaksitumaisiksi ja monitumaisiksi soluiksi jakaantuneiden solujen määrään verrattuna vain 53 % soluista jakaantui käsitellyssä viljelmässä, eli sytostaasi on 47 %.

3. *Kun sytoB:tä ei käytetä*, sytotoksisuus on arvioitava solumäärän suhteellisen lisääntymisen (SMSL) tai populaation suhteellisen kaksinkertaistumisen (PSK) perusteella (58), koska molemmissa otetaan huomioon jakaantuneen solupopulaation osuus.

$$\text{SMSL} = \frac{(\text{solumäärän lisääntyminen käsitellyissä viljelmissä (lopussa – alussa)})}{(\text{solumäärän lisääntyminen kontrolliviljelmissä (lopussa – alussa)})} \times 100$$

$$\text{PSK} = \frac{(\text{populaatioiden kaksinkertaistumisten lukumäärä käsitellyissä viljelmissä})}{(\text{populaatioiden kaksinkertaistumisten lukumäärä kontrolliviljelmissä})} \times 100$$

▼**M3**

jossa:

populaation kaksinkertaistuminen = [log (solumäärä käsittelyn jälkeen ÷ alkuperäinen solumäärä)] ÷ log 2

4. Näin ollen, jos SMSL tai PSK = 53 %, sytotoksisuus/sytostaasi = 47 %.

5. Sytotoksisuutta voidaan arvioida proliferaatioindeksin (PI) avulla laskemalla 1 solusta (kl1), 2 solusta (kl2), 3 tai 4 solusta (kl4) ja 5–8 solusta (kl8) muodostuneiden kloonien määrä seuraavasti

$$PI = \frac{((1 \times kl1) + (2 \times kl2) + (3 \times kl4) + (4 \times kl8))}{(kl1 + kl2 + kl4 + kl8)}$$

6. Proliferaatioindeksiä on käytetty sytotoksisuuden tärkeänä ja luotettavana parametrina myös ilman sytoB:tä *in situ* viljellyille solulinjoille (25) (26) (27) (28).

▼M3

Lisäys 3

Suorituskyvyn arviointiin suositeltavat vertailukemikaalit ([1])

Luokka	Kemikaali	CAS-numero	EC-numero
1. Klastogeenit, jotka ovat aktiivisia ilman metabolista aktivaatiota			
	Sytosiiniarabinosidi	147-94-4	205-705-9
	Mitomysiini C	50-07-7	200-008-6
2. Klastogeenit, jotka edellyttävät metabolista aktivaatiota			
	Bentso(a)pyreeni	50-32-8	200-028-5
	Syklofosfamidi	50-18-0	200-015-4
3. Aneugeenit			
	Kolkisiini	64-86-8	200-598-5
	Vinblastiini	143-67-9	205-606-0
4. Negatiiviset aineet			
	Di(2-etyyliheksyyli)ftalaatti	117-81-7	204-211-0
	Nalidiksiinihappo	389-08-2	206-864-7
	Pyreeni	129-00-0	204-927-3
	Natriumkloridi	7647-14-5	231-598-3

([1]) Vertailukemikaalien käyttöä suositellaan. Korvaavia tai täydentäviä kemikaaleja voidaan lisätä vertailukemikaalien luetteloon, jos niiden vaikutus on tiedossa ja ne indusoivat mikrotumia samoilla toimintamekanismeilla ja jos niiden osoitetaan olevan merkityksellisiä MNvit-menetelmällä testattavien kemikaalien osalta. Käyttötarkoituksesta riippuen perusteluna voidaan esittää myös muun muassa validointitutkimus, jossa on käytetty useita eri aineita tai jossa keskitytään kapeampaan kirjoon testiaineen kemikaaliluokan tai tutkittavan vauriomekanismin perusteella.

▼M3

B.50. **IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYS-MENETELMÄ: DA**

JOHDANTO

1. Kemikaalien testausta koskevia OECD:n suuntaviivoja ja EU:n testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvointiin liittyvien kysymysten perusteella. Ensimmäinen, hiiren ihoherkistyksen määrittämisessä käytettävä testimenetelmä (B.42) eli paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä (Local Lymph Node Assay, LLNA; OECD:n testiohje 429) on tarkistettu (1). LLNA-menetelmän validointia koskevat yksityiskohtaiset tiedot ja siihen liittyvän työn arviointi on julkaistu (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) LLNA-menetelmässä lymfosyyttien proliferaatio määritetään radioisotoopilla leimatun tymidiinin tai jodin avulla. Siksi määritysmenetelmän käyttö on rajattua paikoissa, joissa radioaktiivisten aineiden hankkiminen, käyttö tai hävittäminen on ongelmallista. LLNA: DA -menetelmä (jonka on kehittänyt Daicel Chemical Industries, Ltd) on LLNA-menetelmän mukautus, jossa ei käytetä radioaktiivisia merkkiaineita, vaan jossa lymfosyyttien proliferaatio määritetään bioluminesenssin avulla määritettävän adenosiinitrifosfaattipitoisuuden (ATP-pitoisuuden) avulla. Kansainvälinen vertaisarviointityöryhmä on arvioinut LLNA: DA -testimenetelmän, validoinut sen ja katsonut, että sillä voidaan määrittää ihoa herkistäviä ja muunlaisia kemikaaleja tietyin rajoituksin (10) (11) (12) (13). Tässä selostettu testimenetelmä on suunniteltu kemikaalien (aineiden ja seosten) ihoherkistyspotentiaalin arvioimiseen eläimillä. Tämän liitteen B.6 luvussa ja OECD:n testiohjeessa 406 käytetään marsutestejä, erityisesti marsuilla tehtävää maksimointitestiä ja Bühlerin testiä (14). Käytettäessä LLNA-menetelmää (tämän liitteen B.42 luku; OECD:n testiohje 429) ja sen kahta muuhun kuin radioaktiivisuuteen perustuvaa muunnosta eli LLNA: DA -menetelmää (tämän liitteen B.50 luku; OECD:n testiohje 442 A) ja LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää (tämän liitteen B.51 luku; OECD:n testiohje 442 B) voidaan testeihin käytettävien eläinten määrää vähentää. Näin ollen ne ovat eläinten käytön osalta edistyneempiä B.6 luvussa ja OECD:n testiohjeessa 406 (14) tarkoitettuihin marsutesteihin verrattuna.

2. Kuten LLNA-menetelmässä, myös LLNA: DA -menetelmässä tutkitaan ihoherkistyksen induktiovaihetta ja tuotetaan annosvasteen arviointiin sopivia kvantitatiivisia tuloksia. Koska ihoa herkistäviä aineita voidaan tunnistaa ilman radioaktiivista DNA-merkkiainetta, työssä ei altistuta radioaktiivisuudelle, eikä jätteiden hävittäminen aiheuta ongelmia. Tämä voi johtaa hiirten entistä yleisempään käyttöön ihoa herkistävien aineiden tunnistamisessa, millä puolestaan vähennetään entisestään marsujen käyttämistä ihoherkistyspotentiaalin testauksessa (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) 0.

MÄÄRITELMÄT

3. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

JOHDANTO JA RAJOITUKSET

4. LLNA: DA -menetelmä on LLNA-menetelmän muunnos, jolla voidaan tunnistaa mahdollisia ihoa herkistäviä kemikaaleja tietyin rajoituksin. Tämä ei välttämättä merkitse sitä, että LLNA: DA -menetelmää pitäisi käyttää kaikissa tapauksissa LLNA-menetelmän tai marsutestin asemesta (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (14), vaan pikemminkin sitä, että määritysmenetelmä on yhtä hyvä ja sitä voidaan käyttää vaihtoehtona, jossa positiivisia ja negatiivisia tuloksia ei yleensä enää tarvitse varmistaa uudelleen (10) (11). Testilaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat

▼M3

tiedot ennen tutkimuksen tekemistä. Tällaisia tietoja ovat muun muassa testiaineen tunnistetiedot ja kemiallinen rakenne, sen fysikaaliskemialliset ominaisuudet, muiden testiaineella tehtyjen *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien tulokset sekä rakenteellisesti samankaltaisia kemikaaleja koskevat toksikologiset tiedot. Tietojen perusteella on määritettävä, voidaanko LLNA: DA -menetelmää käyttää kyseisen aineen testaamiseen (ottaen huomioon, että LLNA: DA -menetelmä ei sovellu tiettyjen kemikaalityyppien testaamiseen (katso 5 kohta)) ja mitä annosta on käytettävä.

5. LLNA: DA on *in vivo* -menetelmä, joten sillä ei lopeteta koe-eläinten käyttöä kosketusherkistyksen arvioinnissa. Sillä voidaan kuitenkin vähentää tähän tarkoitukseen käytettävien eläinten määrää marsutesteihin verrattuna (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (14). LLNA: DA -menetelmässä käytetty tapa testata kosketusherkistystä eläimillä on myös huomattavasti edistyneempi (vähemmän kipua ja kärsimystä), koska toisin kuin B.6 menetelmässä ja OECD:n testiohjeessa 406, LLNA: DA -menetelmässä ei edellytetä tarkoituksellista ihon yliherkkyysreaktioiden tuottamista. Vaikka LLNA: DA -menetelmä onkin tietyllä tasolla edistyneempi kuin B.6 menetelmä tai OECD:n testiohje 406 (14), siihen liittyy tiettyjä rajoituksia, joiden vuoksi voi olla tarpeen käyttää B.6 menetelmää tai OECD:n testiohjetta 406 (esimerkiksi tiettyjen metallien testaus, väärät positiiviset löydökset joidenkin ihoa ärsyttävien aineiden, esimerkiksi pinta-aktiivisten aineiden osalta (6) (1 ja tämän liitteen B.42 luku) tai testiaineen liukoisuus). Määritystä häiritseviä (16) funktionaalisia ryhmiä sisältävien kemikaaliluokkien tai aineiden yhteydessä voi olla tarpeen käyttää marsutestejä (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406 (14)). Suositellaan, että LLNA-menetelmälle asetettuja rajoituksia (1 ja tämän liitteen B.42 luku) sovelletaan myös LLNA: DA -menetelmään (10). LLNA: DA -menetelmä ei välttämättä sovellu ATP-pitoisuuksiin vaikuttavien, esimerkiksi ATP-inhibiittoreina toimivien aineiden tai sellaisten aineiden testaukseen, jotka vaikuttavat solun sisäisen ATP:n täsmälliseen määrittämiseen (esimerkiksi ATP:tä hajottavat entsyymit, solun ulkopuolinen ATP imusolmukkeessa). Tällaisia tunnettuja rajoituksia lukuun ottamatta aineet on testattava LLNA: DA -menetelmällä, elleivät kyseisten aineiden ominaisuudet vaikuta LLNA: DA -menetelmän tarkkuuteen. Myös positiivisten rajatulosten mahdollisuus on otettava huomioon, kun saadaan stimulaatioindeksiksi (SI) välillä 1,8–2,5 (katso 31–32 kohta). Tämä perustuu 44 aineen validointitietokantaan, jossa aineiden SI $\geq$ 1,8 (katso 6 kohta) ja jossa LLNA: DA -menetelmällä on tunnistettu oikein kaikki 32 herkistystä aiheuttavaa LLNA-ainetta mutta tunnistettu väärin kolme niistä 12 muusta kuin herkistystä aiheuttavasta LLNA-aineesta, joiden SI-arvo on 1,8–2,5 (positiivinen rajatulos) (10). Koska samaa tulosjoukkoa on käytetty SI-arvojen määrittämiseen ja testin ennakoivien ominaisuuksien laskemiseen, esitetyissä tuloksissa voidaan yliarvioida todellisia ennakoivia ominaisuuksia.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

6. LLNA: DA -menetelmän perusperiaate on, että ihoa herkistävät aineet aiheuttavat lymfosyyttien proliferaatiota imusolmukkeissa, jotka dreneeraavat testiaineen annostelualueen. Tämä proliferaatio on suhteessa käytettyyn annokseen ja allergeenin voimakkuuteen ja tarjoaa yksinkertaisen keinon ihoherkistyksen mittaamiseksi kvantitatiivisella tavalla. Proliferaatio mitataan vertaamalla kussakin testiryhmässä tapahtuvaa keskimääräistä proliferaatiota pelkästään kantaja-aineella käsitellyssä kontrolliryhmässä tapahtuvaan

▼M3

keskimääräiseen proliferaatioon. Kunkin testiryhmän keskimääräisen proliferaation ja sitä vastaavan kontrolliryhmän keskimääräisen proliferaation suhde (SI) määritetään, ja sen on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin 1,8, jotta testiaine olisi syytä arvioida tarkemmin mahdollisesti ihoherkistystä aiheuttavaksi. Tässä määritysmenetelmässä kuvatut menettelyt perustuvat ATP-pitoisuuden mittaamiseen bioluminesenssin avulla (sen tiedetään korreloivan elävien solujen määrää) (17), millä määritetään solujen proliferaation lisääntyminen dreneeraavissa korvalehden imusolmukkeissa (18) (19). Bioluminesenssimenetelmässä lusiferaasientsyymi katalysoi valon muodostusta (luminesenssia) ATP:sta ja lusiferiinista. Reaktio tapahtuu seuraavan kaavan mukaisesti:

$$ATP + Lusiferiini + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oksilusiferiini + AMP + PP_i + CO_2 + Valo$$

ATP	ATP
Luciferin	lusiferiini
O_2	O_2
Luciferase	lusiferaasi
Oxyluciferin	oksilusiferiini
AMP	AMP
PP_i	PP_i
CO_2	CO_2
Light	valo

Emittoituneen valon valovoima on suoraan verrannollinen ATP-pitoisuuteen, ja se mitataan luminometrillä. Lusiferiini-lusiferaasi-määritysmenetelmä on herkkä ATP-pitoisuuden määritysmenetelmä, jota käytetään erilaisissa käyttökohteissa (20).

MÄÄRITYSMENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

7. Tähän testiin paras eläinlaji on hiiri. LLNA: DA -määritysmenetelmän validointitutkimukset on tehty yksinomaan CBA/J-kannalla, joten sen käyttöä suositellaan (12) (13). Määritysmenetelmässä käytetään nuoria täysikasvuisia naarashiiriä, jotka eivät ole poikineet eivätkä ole tiineenä. Testin alussa eläinten on oltava 8–12 viikon ikäisiä, ja eläinten painoerojen on oltava vähäisiä eli enintään 20 prosenttia keskipainosta. Muita kantoja tai uroseläimiä voidaan käyttää, jos tietoja tuotetaan riittävästi sen osoittamiseksi, että LLNA: DA -vasteessa ei esiinny merkitseviä koe-eläinkantaan tai sukupuoleen liittyviä eroja.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

8. Hiiret on pidettävä yhteishäkeissä (21), ellei hiirien pitämiselle erillisissä häkeissä esitetä riittäviä tieteellisiä perusteluja. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 celsiusastetta. Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa on käytettävä keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Eläinten valmistelu

9. Eläimet valitaan satunnaistetusti, merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan (ei kuitenkaan korvamerkeillä), ja pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testiaineen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Ennen käsittelyn alkua kaikki eläimet on tutkittava sen varmistamiseksi, ettei niillä ole havaittavia ihovaurioita.

Annosteluliuosten valmistelu

10. Kiinteät kemikaalit on liuotettava tai sekoitettava liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja tarvittaessa laimennettava ennen niiden annostelua hiiren korvaan. Nestemäiset kemikaalit voidaan annostella laimentamattomana, tai ne voidaan laimentaa ennen annostelua. Liukenemattomat kemikaalit, kuten lääkinnällisissä laitteissa yleisesti käytetyt kemikaalit, on uutettava erittäin voimakkaasti asianmukaiseen liuottimeen, jotta saataisiin testausta varten esiin kaikki uuttuvat ainesosat ennen annostelua hiirten korviin. Testiaineet on valmistettava päivittäin, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

▼M3

Luotettavuuden tarkistus

11. Määritysmenetelmän toimivuus osoitetaan positiivisten kontrollikemikaalien avulla. Herkistystesteissä käytettävän aineen vasteena on saatava aikaan riittävä ja toistettavissa oleva herkistyminen. Vasteen on oltava aineelle tyypillinen. Samanaikaisesti on käytettävä positiivista kontrollikemikaalia, koska sillä osoitetaan, että laboratoriolla on riittävä pätevyys kunkin määritysmenetelmän käyttöön. Sen avulla voidaan myös arvioida laboratorioidenvälistä ja laboratorionsisäistä uusittavuutta ja vertailtavuutta. Jotkut sääntelyviranomaiset vaativat positiivisten kontrollikemikaalien käyttämistä kaikissa tutkimuksissa. Käyttäjien olisikin otettava yhteyttä asiasta vastaaviin viranomaisiin ennen LLNA: DA -määritysmenetelmän käyttöönottoa. Tämän takia suositellaan, että positiivista kontrollikemikaalia käytetään aina näytteiden kanssa samanaikaisesti, jotta ei tarvitsisi tehdä uusia eläinkokeita sellaisten vaatimusten täyttämiseksi, jotka aiheutuvat positiivisten kontrollikemikaalien käyttämisestä vain silloin tällöin (katso 12 kohta). Positiivisen kontrollikemikaalin on tuotettava positiivinen LLNA: DA -vaste altistustasolla, jonka odotetaan antavan negatiiviseen kontrolliryhmään verrattuna stimulaatioindeksin, joka on yhtä suuri tai suurempi kuin 1,8. Positiivisen kontrollikemikaalin annospitoisuus on valittava siten, että se ei aiheuta liian voimakasta ihoärsytystä tai koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja että induktio on toistettavissa mutta ei liian suuri (esimerkiksi SI > 10 on liian suuri). Suositeltavia positiivisia kontrollikemikaaleja ovat 25-prosenttinen heksyylikanelialdehydi (CAS-numero 101-86-0) ja 25-prosenttinen eugenoli (CAS-numero 97-53-0) asetonin ja oliiviöljyn seoksessa (4:1 v/v). Joissakin olosuhteissa voidaan riittävin perustein käyttää muita positiivisia kontrollikemikaaleja, jotka täyttävät edellä mainitut kriteerit.

12. Vaikka positiivisen kontrolliryhmän samanaikaista käyttöä suositellaan, joissakin tapauksissa positiivisen kontrollikemikaalin testaus ajoittain (enintään kuuden kuukauden välein) voi riittää LLNA: DA -menetelmää säännöllisesti käyttävissä laboratorioissa (eli sellaisissa, jotka käyttävät LLNA: DA -menetelmää vähintään kerran kuukaudessa), joilla on aiempia positiivisen kontrollikemikaalin määritystietoja, jotka osoittavat laboratorion valmiuden saada aikaan uusittavissa olevia ja täsmällisiä tuloksia positiivisilla kontrollikemikaaleilla. Riittävä LLNA DA -menetelmää koskeva pätevyys voidaan osoittaa tuottamalla positiivisella kontrollikemikaalilla toistuvasti samantasoisia positiivisia tuloksia vähintään kymmenessä riippumattomassa testissä, jotka suoritetaan kohtuullisen ajanjakson (alle yhden vuoden) aikana.

13. Samanaikaista positiivista kontrolliryhmää olisi käytettävä aina, kun LLNA: DA -menettelyjä muutetaan (esimerkiksi kun koulutettu henkilökunta vaihtuu, testimenetelmän materiaalit ja/tai reagenssit vaihtuvat, testimenetelmässä käytettävät laitteet vaihtuvat tai koe-eläinten alkuperä vaihtuu). Tällaiset muutokset on kirjattava laboratorioraportteihin. Muutosten vaikutusta aiempien määritystietojen asianmukaisuuteen on tarkasteltava, jotta voidaan päättää, onko kerättävä uusi määritystietoja positiivisen kontrollikemikaalin tulosten yhdenmukaisuuden osoittamiseksi.

14. Tutkijoiden on otettava huomioon, että jos positiivisen kontrollikemikaalin tutkimusta ei suoriteta samanaikaisesti vaan vain ajoittain, negatiivisten tutkimustulosten asianmukaisuus ja hyväksyttävyys voivat vaarantua, jos samanaikaista positiivista kontrollia ei testata ajoittain tehtyjen positiivisten kontrollitestien välillä. Jos esimerkiksi saadaan väärä negatiivinen tulos, kun positiivinen kontrolli ei ole ollut aina samanaikaisesti mukana, positiivisen kontrollikemikaalin viimeisen hyväksytyn yksittäisen tutkimuksen ja positiivisen kontrollikemikaalin hylätyn yksittäisen tutkimuksen tuloksen välisenä aikana saadut testiaineen negatiiviset tulokset voivat olla kyseenalaisia. Näiden tulosten seurauksia on tarkasteltava huolellisesti päätettäessä positiivisten kontrollikemikaalien käyttämisestä testiaineen kanssa samanaikaisesti tai vain ajoittain. Olisi myös harkittava pienemmän eläinmäärän käyttämistä testiaineen kanssa samanaikaisesti tehtävää positiivista kontrolliryhmää varten, jos se on tieteellisesti perusteltua ja jos laboratorio osoittaa laboratoriokohtaisten aiempien tietojen perusteella, että hiiriä voidaan käyttää vähemmän (22).

▼M3

15. Vaikka positiiviset kontrollikemikaalit olisi mieluiten testattava kantaja-aineessa, jonka tiedetään antavan aina samanlaisen vasteen (esimerkiksi asetoni:oliiviöljy, 4:1 v/v), voi joidenkin säännösten mukaan olla tarpeen testata aine myös muussa kuin vakiokantaja-aineessa (kliinisesti/kemiallisesti relevantissa aineessa (23)). Jos positiivista kontrollikemikaalia testataan samanaikaisesti eri kantaja-aineessa kuin testiainetta, on samanaikaista positiivista kontrollikemikaalia varten käytettävä erillistä kantaja-ainekontrollia.

16. Arvioitaessa tiettyyn kemikaaliluokkaan kuuluvia tai tietyn vastetason aikaansaavia aineita voidaan myös vertailuaineita käyttää osoittamaan, että testimenetelmällä voidaan osoittaa asianmukaisesti tämäntyyppisten aineiden ihoherkistyspotentiaali. Vertailuaineilla olisi oltava seuraavat ominaisuudet:

— samanlainen rakenne ja toiminta kuin testattavalla aineryhmällä

— tunnetut fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— sopivuutta tukevia tietoja LLNA: DA -menetelmästä

— sopivuutta tukevia tietoja muista eläinmalleista ja/tai ihmisistä.

TESTIMENETTELY

Koe-eläinten määrä ja annostasot

17. Kussakin annostasoryhmässä on oltava vähintään neljä eläintä, ja testiaineesta on käytettävä vähintään kolmea konsentraatiota; lisäksi käytetään samanaikaisesti määritettävää negatiivista kontrolliryhmää, joka käsitellään vain testiaineen kantaja-aineella, sekä positiivista kontrolliryhmää (joka määritetään samanaikaisesti tai joka on määritetty hiljattain, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat). Positiivisesta kontrolliryhmästä on tarvittaessa testattava useita annoksia, etenkin jos positiivista kontrollikemikaalia testataan epäsäännöllisesti. Kontrolliryhmän eläimiä on kohdeltava samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä, paitsi että niitä ei käsitellä testiaineella.

18. Annostaso ja kantaja-aine on valittava lähteissä (2) ja (24) esitettyjen suositusten perusteella. Annostasot valitaan yleensä sopivasta konsentraatiosarjasta, esimerkiksi sarjasta 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ja niin edelleen. Käytettävälle konsentraatiosarjalle on esitettävä asianmukaiset tieteelliset perustelut. Kaikki käytettävissä olevat toksikologiset tiedot (esimerkiksi akuutti toksisuus ja ihoärsytys) sekä rakennetta ja fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia koskevat tiedot kyseisestä testiaineesta (ja/tai rakenteellisesti vastaavista aineista) on tarvittaessa otettava huomioon kolmen peräkkäisen konsentraation valinnassa niin, että suurin konsentraatio edustaa maksimialtistusta, mutta koko elimistöön kohdistuva toksisuus ja/tai liian voimakas paikallinen ihoärsytys kuitenkin vältetään (24) (25). Jos tällaisia tietoja ei ole käytettävissä, voi olla tarpeen tehdä esitesti (katso 21–24 kohta).

19. Kantaja-aine ei saa vaikuttaa testituloksiin tai vääristää niitä. Se on valittava siten, että testiaine liukenee siihen mahdollisimman helposti ja aineen konsentraatio annosteluun sopivassa liuoksessa tai suspensiossa on mahdollisimman suuri. Suositeltavat kantaja-aineet ovat asetoni:oliiviöljy (4:1 v/v), N,N-dimetyyliformamidi, metyylietyyliketoni, propyleeniglykoli ja dimetyylisulfoksidi (6), mutta muitakin kantaja-aineita voidaan käyttää riittävin tieteellisin perustein. Joissakin tilanteissa voi olla tarpeen käyttää lisäkontrolliaineena kliinisesti perusteltua liuotinta tai kaupallista valmistetta, jona testiainetta markkinoidaan. Erityisesti on varmistettava, että hydrofiiliset testiaineet sisällytetään sellaiseen kantaja-ainejärjestelmään, joka vettää ihon eikä valu heti pois, lisäämällä asianmukaisia liukenemista edistäviä aineita (esimerkiksi 1-prosenttinen Pluronic® L92). Pelkkiä vesiliuoksia on siis syytä välttää.

▼M3

20. Yksittäisiä hiirten imusolmukkeita prosessoimalla voidaan arvioida eläinten välistä vaihtelua ja verrata tilastollisesti testiaineella ja kantaja-aineella käsiteltyjen ryhmien tuloksia (katso 33 kohta). Positiivisen kontrolliryhmän hiirten määrän vähentäminen voi olla mahdollista, mutta vain siinä tapauksessa, että tietoja kerätään yksittäisistä eläimistä (22). Tietyt sääntelyviranomaiset vaativat, että tietoja on kerättävä yksittäisistä eläimistä. Yksittäisiä eläimiä koskevien tietojen säännöllisellä keräämisellä edistetään eläinten hyvinvointia, koska siten vältetään päällekkäiset testaukset, jotka ovat tarpeen, jos sääntelyviranomaisten on tarkasteltava tietyllä tavalla (esimerkiksi eläimistä saatuja mittaustietoja yhdistämällä) saatuja testiainetuloksia myöhemmin muiden vaatimusten (esimerkiksi yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot) perusteella.

Testiä edeltävä kartoitus

21. Jos ei ole tietoja, joiden perusteella päätetään suurin testattava annos (katso 18 kohta), on LLNA: DA -menetelmän testeissä käytettävä asianmukainen annostaso selvitettävä ennen päätestiä. Siten saadaan apua enimmäisannoksen valintaan varsinaista LLNA: DA -tutkimusta varten, kun tietoja koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden (katso 24 kohta) ja/tai liian voimakkaan paikallisen ihoärsytyksen (katso 23 kohta) aiheuttavasta konsentraatiosta ei ole saatavilla. Testattavan enimmäisannoksen on vastattava sataa prosenttia nestemäisen testiaineen osalta tai suurinta mahdollista konsentraatiota kiinteiden tai suspendoitujen aineiden osalta.

22. Kartoitustesti suoritetaan varsinaista LLNA: DA -tutkimusta vastaavissa olosuhteissa, kuitenkin niin, että imusolmukkeiden proliferaatiota ei arvioida ja kussakin annosryhmässä voidaan käyttää vähemmän eläimiä. Kussakin annosryhmässä olisi hyvä käyttää yhtä tai kahta eläintä. Kaikkia hiiriä tarkkaillaan päivittäin koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden tai annostelukohdassa esiintyvän paikallisen ärsytyksen kliinisten merkkien havaitsemiseksi. Eläinten paino kirjataan ennen testaamista ja ennen eläinten lopettamista (päivä 8). Kunkin hiiren molemmista korvista tutkitaan eryteeman merkit, ja ne pisteytetään taulukon 1 mukaisesti (25). Korvan paksuus mitataan paksuusmittarilla (esimerkiksi digitaalisella mikrometrillä tai Peacock Dial -paksuusmittarilla) päivänä 1 (ennen annosta), päivänä 3 (noin 48 tunnin kuluttua ensimmäisestä annoksesta), päivänä 7 (24 tuntia ennen lopettamista) ja päivänä 8. Päivänä 8 korvan paksuus voidaan määrittää myös mittaamalla korvan lävistämiseen tarvittava massa sen jälkeen, kun eläimet on lopetettu humaanisti. Paikallinen ärsytys on erittäin voimakas, jos eryteemapisteytyksen arvo $\geq$ 3 ja/tai korvan paksuuntuminen $\geq$ 25 prosenttia minä tahansa mittauspäivänä (26) (27). Suurin varsinaiseen LLNA: DA -tutkimukseen valittava annos on kartoitusta varten määritetyn konsentraatiosarjan (katso 18 kohta) suurin annos, joka ei enää aiheuta koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä.

Taulukko 1

Eryteemapisteytys

Havainto	Pisteet
Ei eryteemaa	0
Hyvin lievä eryteema (tuskin havaittava)	1
Selkeästi erottuva eryteema	2

▼M3

Havainto	Pisteet
Keskivakava–vakava eryteema	3
Vakava eryteema (voimakas punoitus)–karsta, joka estää eryteeman pisteytyksen	4

23. Paitsi korvien paksuuden tilastollisesti merkittävää yli 25 prosentin kasvua (26) (27), myös tilastollisesti merkittävää käsiteltyjen hiirten korvien paksuuden lisääntymistä kontrollihiiriin verrattuna on käytetty ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi LLNA-menetelmässä (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Tilastollisesti merkittävää paksuuntumista voi esiintyä silloinkin, kun korvan paksuuntuminen on alle 25 prosenttia, mutta sen ei katsota liittyvän spesifisesti erittäin voimakkaaseen ärsytykseen (30) (31) (32) (33) (34).

24. Seuraavat kliiniset havainnot voivat kokonaisvaltaisessa arvioinnissa olla osoituksena koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta (35) ja voivat näin ollen olla osoituksena suurimmasta annostasosta, jota varsinaisessa LLNA. DA -menetelmässä voidaan käyttää: muutokset hermoston toiminnassa (esimerkiksi karvojen jäykistyminen, ataksia, vapina ja kouristukset); muutokset käyttäytymisessä (esimerkiksi aggressiivisuus, muutokset turkin hoidossa, aktiivisuustason huomattava muuttuminen); muutokset hengityksessä (hengityksen säännöllisyyden ja syvyyden muutokset, kuten hengenahdistus, hengen haukkominen ja rahina) sekä muutokset ravinnon ja veden kulutuksessa. Arvioinnissa on huomioitava myös letargian ja/tai passiivisuuden merkit, vähäistä tai hetkittäistä kipua suuremman kivun ja kärsimyksen mahdolliset kliiniset merkit tai eläimen painon yli viiden prosentin laskeminen päivästä 1 päivään 8 sekä kuolleisuus. Kuolevat eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta kivusta ja kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti (36).

Varsinaisen tutkimuksen aikataulu

25. Määritysmenetelmän aikataulu on seuraava:

— *Päivä 1:* Määritetään ja kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään mahdollisia kliinisiä havaintoja. Kunkin korvan takaosaan annostellaan 1-prosenttista natriumlauryylisulfaattivesiliuosta (NLS) NLS-liuokseen upotetulla siveltimellä niin että kunkin korvan takaosa peittyy neljällä tai viidellä sivellyksellä. Yhden tunnin kuluttua NLS-käsittelystä kunkin korvan takaosaan annostellaan 25 µl testiaineen, kantaja-aineen tai positiivisen kontrollikemikaalin (samanaikaisen tai hiljattain tehdyn, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat) sopivaa laimennosta.

— *Päivät 2, 3 ja 7:* Toistetaan päivänä 1 suoritettu 1-prosenttisella NLS-vesiliuoksella tehty alustava käsittely ja testiaineen annostelu.

— *Päivät 4, 5 ja 6:* Ei käsittelyä.

— *Päivä 8:* Kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään mahdollisia kliinisiä havaintoja. Noin 24–30 tunnin kuluttua päivänä 7 tehdyn annostelun aloittamisesta eläimet lopetetaan humaanisti. Hiiren kummastakin korvasta leikataan irti dreneeraavat korvalehden imusolmukkeet, ja kunkin eläimen imusolmukkeet upotetaan fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS). Imusolmukkeiden tunnistukseen ja poistamiseen liittyvät tiedot ja kaaviot esitetään lähteessä (22). Paikallista ihovastetta voidaan seurata varsinaisessa tutkimuksessa edelleen sisällyttämällä tutkimussuunnitelmaan täydentäviä parametreja, kuten korvan eryteeman pisteytys tai korvan paksuutta koskevat mittaustulokset (saadaan joko paksuusmittarilla tai ruumiinavauksen yhteydessä tehtävillä korvan lävistämiseen tarvittavan massan mittauksilla).

▼M3

Solususpensioiden valmistus

26. Kunkin hiiren imusolmukeparien soluista valmistetaan yksisolususpensio asettamalla imusolmukkeet kahden objektilasin väliin ja painamalla niitä kevyesti imusolmukkeiden murskaamiseksi. Tämän jälkeen varmistetaan, että kudos on levinnyt objektilaseille ohuesti, ja objektilasit irrotetaan toisistaan varovasti. Molemmilla objektilaseilla oleva kudos suspendoidaan PBS-liuokseen niin, että kumpaakin objektilasia pidetään kallistettuna petrimaljan yläpuolella ja huuhdellaan PBS-liuoksella samalla, kun kudosta raaputetaan objektilasista soluraaputtimella. Negatiivisen kontrolliryhmän eläinten imusolmukkeet ovat pieniä, joten vaihe on suoritettava huolellisesti SI-arvoihin mahdollisesti vaikuttavien artefaktojen välttämiseksi. Molemmat objektilasit on huuhdeltava yhteensä 1 ml:lla PBS-liuosta. Imusolmukeparien soluista petrimaljaan valmistettu suspensio homogenoidaan kevyesti soluraaputtimella. Tämän jälkeen imusolmukeparien soluista valmistetusta suspensiosta otetaan 20 µl:n mittausnäyte mikropipetillä niin, ettei näytteeseen tule mukaan silmämääräisesti havaittavaa kalvoa. Suspensio sekoitetaan 1,98 ml:aan PBS-liuosta, jolloin saadaan 2 ml:n näyte. Tämän jälkeen valmistetaan toinen 2 ml:n näyte samalla menettelyllä niin, että kustakin eläimestä saadaan kaksi näytettä.

Solujen proliferaation määritys (lymfosyyttien ATP-pitoisuuden mittaaminen)

27. Imusolmukkeiden ATP-pitoisuuden kasvua mitataan lusiferiini/lusiferaasimenetelmällä käyttämällä ATP-määrityskittiä, jolla mitataan bioluminesenssia suhteellisina valoyksikköinä (Relative Luminescence Unit, RLU). Määritys tehdään aikana, joka ulottuu imusolmukkeiden eläimestä irrottamisesta ATP-pitoisuuden mittaamiseen. Sen on oltava kunkin eläimen osalta sama noin 30 minuutin tarkkuudella, sillä ATP-pitoisuuden katsotaan laskevan vähitellen sen jälkeen, kun eläin on kuollut (12). Näin ollen menettely, joka käynnistyy korvalehden imusolmukkeiden irrottamisesta ja päättyy ATP-mittaukseen, olisi saatava päätökseen 20 minuutin sisällä etukäteen määritettyyn määräaikaan mennessä, joka on sama kaikille eläimille. ATP:n luminesenssi on mitattava kustakin 2 ml:n näytteestä. Kullakin eläimellä tehdään siis yhteensä kaksi ATP-mittausta. Tämän jälkeen määritetään ATP:n keskimääräinen luminesenssi, jota käytetään myöhemmin tehtävissä laskelmissa (katso 30 kohta).

HAVAINNOT

Kliiniset havainnot

28. Kustakin hiirestä on päivittäin havainnoitava huolellisesti mahdolliset kliiniset merkit joko annostelualueen paikallisesta ärsytyksestä tai koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti erikseen kustakin hiirestä. Seurantasuunnitelmissa on esitettävä myös perusteet, joiden avulla voidaan nopeasti tunnistaa hiiret, joissa havaitaan merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta, liian voimakkaasta paikallisesta ihoärsytyksestä tai ihosyövyttävyydestä ja jotka on lopetettava (36).

Ruumiinpainot

29. Kuten 25 kohdassa todetaan, kukin eläin on punnittava erikseen testin alussa ja aikataulun mukaisesti humaanin lopettamisen yhteydessä.

TULOSTEN LASKEMINEN

30. Kunkin käsittelyryhmän tulokset ilmoitetaan keskimääräisenä SI:nä. Sl-arvo saadaan jakamalla testiaineryhmän ja positiivisen kontrolliryhmän hiirikohtaisista RLU-arvoista laskettu keskiarvo liuotin/kantaja-ainekontrollin vastaavalla tuloksella. Kantaja-ainekontrolliryhmien SI:n keskiarvo on 1.

▼M3

31. Tulos katsotaan positiiviseksi, kun SI ≥ 1,8 (10). Rajatuloksen (SI-arvo 1,8–2,5) positiivisuuden määrittämiseksi voidaan kuitenkin tarkastella myös annos-vastesuhteen voimakkuutta, tilastollista merkitsevyyttä sekä liuottimen/kantaja-aineen ja positiivisen kontrollikemikaalin vasteiden yhdenmukaisuutta (2) (3) (37).

32. Jos positiivisen rajavasteen SI on 1,8–2,5, käyttäjät voivat tulosten positiivisuuden vahvistamiseksi tarkastella SI-arvojen lisäksi myös muita tietoja, kuten annos-vastesuhdetta, merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta tai liian voimakkaasta ärsytyksestä ja tarvittaessa tilastollista merkittävyyttä (10). Lisäksi on syytä ottaa huomioon testiaineen ominaisuudet, mukaan luettuina mahdolliset rakenteelliset yhtäläisyydet tunnettuihin ihoherkistystä aiheuttaviin aineisiin, sen hiirelle mahdollisesti aiheuttama erittäin voimakas ihoärsytys ja havaitun annosvasteen luonne. Näitä ja muita huomionarvoisia seikkoja käsitellään yksityiskohtaisesti lähteessä (4).

33. Kun tietoja kerätään erikseen kustakin hiirestä, tietojen perusteella voidaan analysoida tilastollisesti mahdollista annosvasteen olemassaoloa ja sen voimakkuutta. Tilastoanalyysissä voidaan muun muassa arvioida annos-vastesuhdetta ja tehdä asianmukaisesti mukautettuja vertailuja testiryhmillä (esimerkiksi pareittain annoksen saaneen ryhmän vertailu samaan aikaan tehtyyn liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmään). Tilastollisina analyyseina voidaan käyttää esimerkiksi lineaarista regressiota tai Williamsin testiä, joilla arvioidaan annos-vasteen suuntauksia, sekä Dunnettin testiä, jolla pareja vertaillaan toisiinsa. Tutkijan on otettava asianmukaisen tilastoanalyysimenetelmän valinnassa huomioon varianssien mahdolliset erot ja muut vastaavat ongelmat, jotka saattavat edellyttää määritystulosten muuntamista tai non-parametrista tilastoanalyysia. Joka tapauksessa tutkijan on mahdollisesti tehtävä SI-laskelmia ja tilastoanalyyseja sekä käyttäen tiettyjä määrityspisteitä koskevia tietoja (niin sanotut käyrän ulkopuolella olevat vasteet) että ilman niitä.

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Mittaustulokset

34. Mittaustulokset on esitettävä taulukkona, josta käyvät ilmi eläinkohtaiset RLU-arvot, ryhmän eläinkohtaisten RLU-arvojen keskiarvo, siihen liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe) sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen SI samanaikaiseen liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmään verrattuna.

Testiraportti

35. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrollikemikaalit

— tunnistetiedot (esimerkiksi CAS- ja EC-numerot, jos tiedossa; alkuperä, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, eränumero),

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet (esimerkiksi haihtuvuus, stabiilisuus, liukoisuus),

— jos kyseessä on seos, sen koostumus ja ainesosien suhteelliset osuudet.

Liuotin/kantaja-aine

— tunnistetiedot (puhtaus, tarvittaessa konsentraatio, käytetty tilavuus),

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

▼**M3**

Koe-eläimet

— CBA-hiirten alkuperä,

— eläinten mikrobiologinen tila, jos se on tiedossa,

— eläinten määrä ja ikä,

— eläinten alkuperä, koe-eläintilat, ruokavalio ja niin edelleen.

Testiolosuhteet

— ATP-määrityskitin alkuperä, eränumero ja valmistajan laadunvarmistus-/laadunvalvontatiedot,

— tiedot testiaineen valmistelusta ja annostelusta,

— perustelut annostasojen valinnalle (mukaan luettuina kartoitustestin tulokset, jos sellainen on tehty),

— käytetyt kantaja- ja testiaineiden konsentraatiot ja annostellun testiaineen kokonaismäärä,

— tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan luettuina ruokavalion tyyppi/alkuperä, veden alkuperä),

— tiedot käsittely- ja näytteenottoaikatauluista,

— toksisuuden määritysmenetelmät,

— tulosten positiivisuuden tai negatiivisuuden arviointiperusteet,

— tiedot tutkimussuunnitelmasta poikkeamisesta ja selvitys siitä, miten poikkeaminen vaikuttaa tutkimuksen suunnitteluun ja tuloksiin.

Luotettavuuden tarkistus

— yhteenveto viimeisimmän luotettavuustarkistuksen tuloksista, mukaan luettuina tiedot käytetystä testiaineesta, konsentraatiosta ja kantaja-aineesta,

— testauslaboratorion samanaikaisesti ja/tai aiemmin tehtyjen positiivisten ja samanaikaisesti tehtyjen negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) kontrollien tulokset,

— jos mukana ei ollut samanaikaista positiivista kontrollia, viimeisimmän yksittäisen positiivisen kontrollin päivämäärä ja laboratorioraportti sekä yksityiskohtainen selvitys laboratorion aiemmista positiivista kontrollia koskevista tiedoista, joiden perusteella positiivista kontrollia ei tarvitse tehdä joka kerta.

Tulokset

— kunkin hiiren paino annostelun alussa ja aikataulun mukaisen lopettamisen yhteydessä sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen ja asiaan liittyviin muuttujiin liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe),

— toksisuuden ilmeneminen ajan funktiona ja toksisuuden merkit, mukaan luettuna annostelualueen ihoärsytys, jos sellaista esiintyy, erikseen kullekin eläinyksilölle,

— eläinten lopettamisen ja ATP-mittauksen ajankohta kunkin eläimen osalta,

— taulukko yksittäisten hiirten RLU-arvoista ja SI-arvoista kunkin käsitellyn annosryhmän osalta,

— kunkin käsittelyryhmän hiirikohtaisen RLU-arvon keskimääräinen virhetermi ja asiaan liittyviin muuttujiin liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta ja keskiarvon keskivirhe) sekä käyrän ulkopuolella olevien vasteiden analyysin tulokset kullekin käsittelyryhmälle,

▼M3

— laskettu SI ja asianmukaisesti määritetty vaihteluväli, jossa otetaan huomioon eläintenvälinen vaihtelu sekä testiaineella että kontrolliaineella käsitellyissä ryhmissä,

— annos-vastesuhde,

— tarvittaessa tilastoanalyysit.

Tulosten pohdinta

— tulosten lyhyt kommentointi, annos-vasteanalyysi ja tarvittaessa tilastoanalyysit sekä johtopäätös siitä, voidaanko testiainetta pitää ihoherkistystä aiheuttavana.

LÄHDELUETTELO

(1) OECD (2010). *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) Chamberlain, M. ja Basketter, D. A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol*. 34, s. 999–1002.

(3) Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. ja Loveless, S. E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol*. 34, s. 985–997.

(4) Basketter, D. A., Gerberick, G. F. ja Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.* 36, s. 327–333.

(5) Van Och, F. M. M., Slob, W., De Jong, W. H., Vandebriel, R. J. ja Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*. 146, s. 49–59.

(6) ICCVAM (1999). The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH-julkaisunumero 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llna-rep.pdf

(7) Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G., Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34, s. 258–273.

(8) Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34, a. 274–286.

(9) Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34, s. 249–257.

(10) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd, based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH-julkaisunumero 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm

▼M3

(11) ICCVAM (2009). Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf.

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. ja Ito, M. (2008). Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 58, s. 1–10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. ja Yuasa, A. (2008). Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 58, s. 11–26.

(14) OECD (1992). *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoittessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. ja Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*. 46, s. 1896–1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. ja Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 55, s. 90–96.

(17) Crouch, S. P., Kozlowski, R., Slater, K. J. ja Fletcher J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*. 160, s. 81–88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. ja Matsumoto, S. (1984). Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*. 72, s. 127–132.

(19) Dexter, S. J., Cámara, M., Davies, M. ja Shakesheff, K. M. (2003). Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.* 24, s. 27–34.

(20) Lundin A. (2000). Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*. 305, s. 346–370.

(21) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7. painos. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH-julkaisunumero 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf

(23) McGarry, H. F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*. 238, s. 71–89.

(24) Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes, E. W. ja Basketter, D. A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*. 93, s. 13–31.

(25) OECD (2002). *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼M3

(26) Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L. ja DeGeorge, G. L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist* 96, s. 235.

(27) ICCVAM (2009). Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf.

(28) Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. ja Meade, B. J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.* 21, s. 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. ja Vohr, V. W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 153, s. 83–94.

(30) Woolhiser, M. R., Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.* 8, s. 245–256.

(31) Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol*. 22, s. 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A. O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. ja Vohr, H. W. (2005). A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*. 212, s. 60–68.

(33) Vohr, H. W. ja Ahr, H. J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.* 79, s. 721–728.

(34) Patterson, R. M., Noga, E. ja Germolec, D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*. 115, s. 1023–1028.

(35) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm

(36) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladies, G. S., Loveless, S. E. ja Hastings, K. L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health* 53, s. 563–79.

(38) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssia) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (38).

Vertailuaine: Herkistävä tai muu kuin herkistävä aine, jota käytetään testiaineen vertailustandardina. Vertailuaineella on oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana, ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testiaineryhmällä, iii) tunnetut fysikaaliskemialliset ominaisuudet, iv) todisteet tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellulla vasteen vaihteluvälillä.

Väärä negatiivinen: Aine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein negatiiviseksi tai inaktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on positiivinen tai aktiivinen.

Väärä positiivinen: Aine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein positiiviseksi tai aktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on negatiivinen tai inaktiivinen.

Vaarallisuus: Mahdollisuus kielteiseen terveys- tai ympäristövaikutukseen. Kielteinen vaikutus edellyttää altistumista vähintään tietyllä tasolla.

Laboratorioidenvälinen uusittavuus: Se, missä määrin eri (pätevät) laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samoja tutkimussuunnitelmia ja testaamalla samoja testiaineita. Laboratorioidenvälinen uusittavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyissä, ja se osoittaa, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (38).

Laboratorionsisäinen uusittavuus: Se, missä määrin pätevä laboratoriohenkilöstö voi (kyseisessä laboratoriossa) saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimussuunnitelmaa eri ajankohtina (38).

Käyrän ulkopuolella oleva vaste: Käyrän ulkopuolella olevalla vasteella tarkoitetaan havaintoa, joka poikkeaa merkittävästi muista populaation sattumanvaraisten näytteiden arvoista.

Laadunvarmistus: Hallintomenettely, jossa testausta suorittavista henkilöistä riippumattomat henkilöt arvioivat laboratorion testausstandardien, vaatimusten ja kirjanpitomenettelyjen noudattamista ja tiedonsiirron tarkkuutta.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on uusittavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa tutkimussuunnitelmaa. Luotettavuus arvioidaan laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus (38).

Ihoherkistys: Immunologinen prosessi, joka aiheutuu herkän yksilön paikallisesta altistamisesta tietylle kemialliselle allergeenille, joka aiheuttaa iholla immuunivasteen, joka voi johtaa kosketusherkistykseen.

Stimulaatioindeksi (SI): Testiaineen ihoärsytyspotentiaalin arvioimiseksi laskettu arvo, jolla esitetään käsiteltyjen ryhmien soluproliferaation ja samanaikaisesti kantaja-aineella käsitellyn kontrolliryhmän soluproliferaation välinen suhde.

Testiaine (testikemikaali): Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

▼M3

B.51. **IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYS-MENETELMÄ: BRDU-ELISA**

JOHDANTO

1. Kemikaalien testausta koskevia OECD:n suuntaviivoja ja EU:n testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvointiin liittyvien kysymysten perusteella. Ensimmäinen, hiirten ihoherkistyksen määrittämisessä käytettävä testimenetelmä (B.42) eli paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä (Local Lymph Node Assay, LLNA; OECD:n testiohje 429) on tarkistettu (1 ja tämän liitteen B.42 luku). LLNA-menetelmän validointia koskevat yksityiskohtaiset tiedot ja yleiskatsaus siihen liittyneestä työstä on julkaistu (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). LLNA-menetelmässä lymfosyyttien proliferaatio määritetään radioisotoopilla leimatun tymidiinin tai jodin avulla. Siksi määritysmenetelmän käyttö on rajattua paikoissa, joissa radioaktiivisten aineiden hankkiminen, käyttö tai hävittäminen on ongelmallista. LLNA: BrdU-ELISA (entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritysmenetelmä) on LLNA-testimenetelmän muunnos, jossa ei käytetä radioisotooppeja ja jossa lymfosyyttien proliferaatio määritetään ELISA-testijärjestelmässä käyttämällä ei-radioaktiivisesti merkattua 5-bromi-2-deoksiuridiinia (BrdU) (CAS-numero 59-14-3). Kansainvälinen riippumaton tieteellinen vertaisarviointityöryhmä on arvioinut LLNA: BrdU-ELISA -testimenetelmä, validoinut sen ja katsonut, että sillä voidaan määrittää ihoa herkistäviä ja muita kuin herkistäviä kemikaaleja tietyin rajoituksin (10) (11) (12). Tämä testimenetelmä on suunniteltu kemikaalien (aineiden ja seosten) ihoherkistyspotentiaalin arvioimiseen eläimillä. Tämän liitteen B.6 luvussa ja OECD:n testiohjeessa 406 käytetään marsutestejä, erityisesti marsuilla tehtävää maksimointitestiä ja Bühlerin testiä (13). LLNA-menetelmällä (tämän liitteen B.42 luku; OECD:n testiohje 429) ja sen kahdella muuhun kuin radioaktiivisuuteen perustuvalla mukautuksella eli LLNA: BrdU-ELISA -menetelmällä (tämän liitteen B.51 luku; OECD:n testiohje 442 B) ja LLNA: DA -menetelmällä (tämän liitteen B.50 luku; OECD:n testiohje 442 A) voidaan kaikilla vähentää testeihin käytettävien eläinten määrää. Näin ollen ne ovat eläinten käytön osalta edistyneempiä kuin B.6 luvussa ja OECD:n testiohjeessa 406 (13) tarkoitetut marsutestit.

2. Kuten LLNA-menetelmässä, myös LLNA: BrdU-ELISA -menetelmässä tutkitaan ihoherkistyksen induktiovaihetta ja tuotetaan annosvasteen arviointiin sopivia kvantitatiivisia tuloksia. Koska ihoa herkistäviä aineita voidaan tunnistaa ilman radioaktiivista DNA-merkkiainetta, työssä ei altistuta radioaktiivisuudelle, eikä jätteiden hävittäminen aiheuta ongelmia. Tämä voi johtaa hiirten entistä yleisempään käyttöön ihoa herkistävien aineiden tunnistamisessa, millä puolestaan vähennetään entisestään marsujen käyttämistä ihoherkistyspotentiaalin testauksessa (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (13).

MÄÄRITELMÄT

3. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

JOHDANTO JA RAJOITUKSET

4. LLNA: BrdU-ELISA -menetelmä on mukautettu LLNA-menetelmä mahdollisten ihoa herkistävien kemikaalien tunnistamiseksi tietyin rajoituksin. Tämä ei välttämättä merkitse sitä, että LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää pitäisi käyttää kaikissa tapauksissa LLNA-menetelmän tai marsutestin asemesta (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (13), vaan pikemminkin sitä, että määritysmenetelmä on yhtä hyvä ja sitä voidaan käyttää vaihtoehtona, jossa positiivisia ja negatiivisia tuloksia ei yleensä enää tarvitse varmistaa uudelleen (10) (11). Testilaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen tekemistä. Tällaisia

▼M3

tietoja ovat muun muassa testiaineen tunnistetiedot ja kemiallinen rakenne, sen fysikaaliskemialliset ominaisuudet, muiden aineella tehtyjen *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien tulokset sekä rakenteellisesti samankaltaisten kemikaalien toksikologiset tiedot. Tietojen perusteella on määritettävä, voidaanko LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää käyttää kyseisen aineen testaamiseen (ottaen huomioon, että LLNA: BrdU-ELISA -menetelmä ei sovellu tiettyjen kemikaalityyppien testaamiseen (katso 5 kohta)) ja mitä annosta on käytettävä.

5. LLNA: BrdU-ELISA on *in vivo* -menetelmä, joten sen käyttö ei merkitse koe-eläinten käytön loppumista kosketusherkistyksen arvioinnissa. Sillä voidaan kuitenkin vähentää tähän tarkoitukseen käytettävien eläinten määrää marsutesteihin verrattuna (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (13). LLNA: BrdU-ELISA -menetelmässä käytetty tapa testata kosketusherkistystä eläimillä on myös huomattavasti edistyneempi, koska toisin kuin B.6 menetelmässä ja OECD:n testiohjeessa 406, LLNA: BrdU-ELISA -menetelmässä ei edellytetä tarkoituksellista ihon yliherkkyysreaktioiden tuottamista. LLNA: BrdU-ELISA -menetelmä ei myöskään edellytä adjuvantin käyttöä, toisin kuin marsuilla tehtävä maksimointitesti (tämän liitteen B.6 luku, 13). Näin ollen LLNA: BrdU-ELISA -menetelmällä vähennetään eläinten kärsimystä. Vaikka LLNA: BrdU-ELISA -menetelmä onkin tietyllä tasolla edistyneempi kuin B.6 menetelmä tai OECD:n testiohje 406 (13), siihen liittyy tiettyjä rajoituksia, joiden vuoksi voi olla tarpeen käyttää B.6 menetelmää tai OECD:n testiohjetta 406 (esimerkiksi tiettyjen metallien testaus, väärät positiiviset löydökset joidenkin ihoa ärsyttävien aineiden, esimerkiksi pinta-aktiivisten aineiden osalta (6) (1 ja tämän liitteen B.42 luku) tai testiaineen liukoisuus). Häiritseviä (15) funktionaalisia ryhmiä sisältävien kemikaaliluokkien tai aineiden yhteydessä voi olla tarpeen käyttää marsutestejä (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406 (13)). LLNA-menetelmälle asetettuja rajoituksia (1 ja tämän liitteen B.42 luku) on sovellettava myös LLNA: BrdU-ELISA -menetelmään (10). Tällaisia tunnistettuja rajoituksia lukuun ottamatta mitä tahansa kemikaaleja pitäisi voida testata LLNA: BrdU-ELISA -menetelmällä, elleivät kyseisten kemikaalien ominaisuudet vaikuta LLNA: BrdU-ELISA -menetelmän tarkkuuteen. Myös positiivisten rajatulosten mahdollisuus on otettava huomioon, kun saadaan stimulaatioindeksiksi (SI) 1,6–1,9 (katso 31–32 kohta). Tämä perustuu 43 aineen validointitietokantaan, jossa aineiden SI $\geq$ 1,6 (katso 6 kohta) ja jossa LLNA: BrdU-ELISA -menetelmällä on tunnistettu oikein kaikki 32 herkistystä aiheuttavaa LLNA-ainetta mutta tunnistettu väärin kaksi niistä 11 muusta kuin herkistystä aiheuttavasta LLNA-aineesta, joiden SI-arvo on 1,6–1,9 (positiivinen rajatulos) (10). Koska samaa tulosjoukkoa on käytetty SI-arvojen määrittämiseen ja testin ennakoivien ominaisuuksien laskemiseen, esitetyissä tuloksissa voidaan yliarvioida todellisia ennakoivia ominaisuuksia.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

6. LLNA: BrdU-ELISA -menetelmän perusperiaate on, että ihoa herkistävät aineet aiheuttavat lymfosyyttien proliferaatiota imusolmukkeissa, jotka dreneeraavat testiaineen annostelualueen. Tämä proliferaatio on suhteessa käytettyyn annokseen ja allergeenin voimakkuuteen ja tarjoaa yksinkertaisen keinon ihoherkistyksen mittaamiseksi kvantitatiivisella tavalla. Proliferaatio mitataan vertaamalla kussakin testiryhmässä tapahtuvaa keskimääräistä soluproliferaatiota kantaja-aineella käsitellyssä kontrolliryhmässä tapahtuvaan keskimääräiseen soluproliferaatioon. Kunkin testiryhmän keskimääräisen soluproliferaation ja sitä vastaavan kontrolliryhmän keskimääräisen soluproliferaation suhde (SI) määritetään, ja sen on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin 1,6, jotta testiaineen mahdollista ihoherkistyspotentiaalia olisi syytä

▼M3

arvioida tarkemmin. Tässä kuvatut menetelmät perustuvat korvalehden dreneeraavien imusolmukkeiden solujen lisääntymisen määrittämiseen BrdU-pitoisuuden mittaamisen avulla. BrdU on tymidiinin analogi ja inkorporoituu lisääntyvien solujen DNA:han samalla tavalla. BrdU:n inkorporoitumista mitataan ELISA-menetelmällä, jossa käytetään BrdU-spesifistä vasta-ainetta, joka leimataan myös peroksidaasilla. Kun lisätään peroksidaasi-entsyymin substraatti, peroksidaasi reagoi substraatin kanssa ja muodostaa värillisen tuotteen, jonka määrä määritetään mittaamalla absorbanssi tietyllä aallonpituudella käyttämällä kuoppalevyjen lukulaitetta.

MÄÄRITYSMENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

7. Tähän testiin paras eläinlaji on hiiri. LLNA: BrdU-ELISA -määritysmenetelmän validointitutkimukset on tehty yksinomaan CBA/JN-kannalla, joten sen käyttöä suositellaan (10) (12). Määritysmenetelmässä käytetään nuoria täysikasvuisia naarashiiriä, jotka eivät ole poikineet eivätkä ole tiineenä. Testin alussa eläinten on oltava 8–12 viikon ikäisiä, ja eläinten painoerojen on oltava vähäisiä eli enintään 20 prosenttia keskipainosta. Muita kantoja tai uroseläimiä voidaan käyttää, jos tietoja tuotetaan riittävästi sen osoittamiseksi, että LLNA: BrdU-ELISA -vasteessa ei esiinny merkitseviä koe-eläinkantaan tai sukupuoleen liittyviä eroja.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

8. Hiiret on pidettävä yhteishäkeissä (16), ellei hiirien pitämiselle erillisissä häkeissä esitetä riittäviä tieteellisiä perusteluja. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 celsiusastetta. Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70 prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, on kuitenkin pyrittävä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa on käytettävä keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Eläinten valmistelu

9. Eläimet valitaan satunnaistetusti, merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan (ei kuitenkaan korvamerkeillä), ja pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testiaineen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Ennen käsittelyn alkua kaikki eläimet on tutkittava sen varmistamiseksi, ettei niillä ole havaittavia ihovaurioita.

Annosteluliuosten valmistelu

10. Kiinteät kemikaalit on liuotettava tai sekoitettava liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja tarvittaessa laimennettava ennen niiden annostelua hiiren korvaan. Nestemäiset kemikaalit voidaan annostella laimentamattomana tai ennen annostelua laimennettuina. Liukenemattomia kemikaaleja, kuten lääkinnällisissä laitteissa yleisesti käytettyjä kemikaaleja, on pyrittävä uuttamaan erittäin voimakkaasti asianmukaiseen liuottimeen, jotta kaikki uuttuvat ainesosat tulisivat esiin ennen annostelua hiirten korviin. Testiaineet on valmistettava päivittäin, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

Luotettavuuden tarkistus

11. Positiivisia kontrollikemikaaleja käytetään, jotta voidaan osoittaa määritysmenetelmän toimivuus. Herkistystesteissä käytettävän aineen vasteena on menetelmässä saatava aikaan riittävä ja toistettavissa oleva herkistyminen, jonka vastetaso on aineelle tyypillinen. Positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä testissä samanaikaisesti testikemikaalin kanssa suositellaan, koska sillä osoitetaan, että laboratoriolla on riittävä pätevyys kuhunkin määritysmenetelmään, ja sen avulla voidaan arvioida laboratorionsisäistä ja laboratorioidenvälistä uusittavuutta ja vertailtavuutta. Myös tietyt sääntelyviranomaiset vaativat positiivisten kontrollikemikaalien käyttämistä kaikissa tutkimuksissa. Käyttäjien olisikin otettava yhteyttä asiasta vastaaviin

▼M3

viranomaisiin ennen LLNA: BrdU-ELISA -määritysmenetelmän käyttöönottoa. Tämän takia suositellaan positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä samanaikaisesti rutiininomaisesti, jotta ei tarvitsisi uusia eläinkokeita sellaisten vaatimusten täyttämiseksi, jotka johtuvat siitä, että positiivista kontrollikemikaalia käytetään vain ajoittain (katso 12 kohta). Positiivisen kontrollikemikaalin on tuotettava positiivinen LLNA: BrdU-ELISA -vaste altistustasolla, jonka odotetaan antavan stimulaatioindeksin, joka on yhtä suuri tai suurempi kuin 1,6 verrattuna negatiiviseen kontrolliryhmään. Positiivisen kontrollikemikaalin annostaso on valittava siten, että se ei aiheuta liian voimakasta ihoärsytystä tai koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja että induktio on toistettavissa mutta ei liian suuri (esimerkiksi SI > 14 on liian suuri). Suositeltavia positiivisia kontrollikemikaaleja ovat 25-prosenttinen heksyylikanelialdehydi (CAS-numero 101-86-0) ja 25-prosenttinen eugenoli (CAS-numero 97-53-0) asetonin ja oliiviöljyn seoksessa (4:1 v/v). Joissakin olosuhteissa voidaan riittävin perustein käyttää muita positiivisia kontrollikemikaaleja, jotka täyttävät edellä mainitut kriteerit.

12. Vaikka samanaikaisen positiivisen kontrolliryhmän käyttöä suositellaan, joissakin tapauksissa positiivisen kontrollikemikaalin ajoittainen testaus (enintään kuuden kuukauden välein) voi riittää LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää säännöllisesti käyttävissä laboratorioissa (eli sellaisissa, jotka käyttävät LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää vähintään kerran kuukaudessa) ja joilla on aiempia positiivisen kontrollikemikaalin määritystietoja, jotka osoittavat laboratorion valmiuden saada aikaan uusittavissa olevia ja täsmällisiä tuloksia positiivisilla kontrollikemikaaleilla. Riittävä LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää koskeva pätevyys voidaan osoittaa tuottamalla positiivisella kontrollikemikaalilla toistuvasti samantasoisia positiivisia tuloksia vähintään kymmenessä riippumattomassa testissä, jotka suoritetaan kohtuullisen ajanjakson kuluessa (alle yhden vuoden aikana).

13. Samanaikaista positiivista kontrollikemikaalia on käytettävä aina, kun LLNA: BrdU-ELISA -menettelyä muutetaan (esimerkiksi kun koulutettu henkilökunta vaihtuu, testimenetelmän materiaalit ja/tai reagenssit vaihtuvat, testimenetelmässä käytettävät laitteet vaihtuvat tai koe-eläinten alkuperä vaihtuu), ja tällaiset muutokset on kirjattava laboratorioraportteihin. Muutosten vaikutusta aiemmin saatujen aiempien määritystietojen asianmukaisuuteen on tarkasteltava, jotta voidaan päättää, onko kerättävä uusi määritystietokanta positiivisen kontrollikemikaalin tulosten yhdenmukaisuuden osoittamiseksi.

14. Tutkijoiden on otettava huomioon, että jos positiivisen kontrollikemikaalin tutkimusta ei suoriteta samanaikaisesti vaan vain ajoittain, positiivisen kontrollikemikaalin kunkin säännöllisen tutkimuksen välillä ilman vastaavaa positiivista kontrollikemikaalia aikaan saatujen negatiivisten tutkimustulosten asianmukaisuus ja hyväksyttävyys voivat vaarantua. Jos esimerkiksi saadaan väärä negatiivinen tulos, kun positiivinen kontrolli ei ole ollut aina samanaikaisesti mukana, positiivisen kontrollikemikaalin viimeisen hyväksytyn yksittäisen tutkimuksen ja positiivisen kontrollikemikaalin hylätyn yksittäisen tutkimuksen tuloksen välisenä aikana saadut testiaineen negatiiviset tulokset voivat olla kyseenalaisia. Näiden tulosten seurauksia on tarkasteltava huolellisesti päätettäessä positiivisten kontrollikemikaalien käyttämisestä aina testiaineen rinnalla tai vain ajoittain Lisäksi on huomioitava, että testiaineen rinnalla käytettävää positiivista kontrolliryhmää varten olisi käytettävä vähemmän eläimiä, jos se on tieteellisesti perusteltua ja jos laboratorio osoittaa laboratoriokohtaisten aiempien tietojen perusteella, että hiiriä voidaan käyttää vähemmän (17).

15. Vaikka positiiviset kontrollikemikaalit on testattava kantaja-aineessa, jonka tiedetään antavan aina samanlaisen vasteen (esimerkiksi asetoni:oliiviöljy, 4:1 v/v), joidenkin säännösten mukaan testaus muussa kuin standardikantaja-aineessa (kliinisesti/kemiallisesti relevantissa aineessa) saattaa myös olla tarpeen (18). Jos samanaikaista positiivista kontrollikemikaalia testataan eri kantaja-aineessa kuin testiainetta, sitä varten on käytettävä erillistä kantaja-aineella käsiteltyä kontrollia.

▼M3

16. Arvioitaessa tiettyyn kemikaaliluokkaan kuuluvia tai tietyn vastetason aikaansaavia testiaineita vertailuaineilla voidaan myös osoittaa, että testimenetelmä toimii asianmukaisesti, kun halutaan osoittaa tämäntyyppisten testiaineiden ihoherkistyspotentiaali. Vertailuaineilla olisi silloin oltava seuraavat ominaisuudet:

— samanlainen rakenne ja toiminta kuin testattavalla aineryhmällä

— tunnetut fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— sopivuutta tukevia tietoja LLNA: DA -menetelmästä

— sopivuutta tukevia tietoja muista eläinmalleista ja/tai ihmisistä.

TESTIMENETTELY

Koe-eläinten määrä ja annostasot

17. Kussakin annostasoryhmässä on oltava vähintään neljä eläintä, ja testiaineesta on käytettävä vähintään kolmea konsentraatiota. Lisäksi käytetään negatiivista kontrolliryhmää, joka käsitellään vain testiaineen kantaja-aineella, sekä positiivista kontrolliryhmää (joka määritetään samanaikaisesti tai joka on määritetty hiljattain, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat). Positiivisesta kontrolliryhmästä on tarvittaessa testattava useita annoksia, etenkin jos positiivista kontrollikemikaalia testataan epäsäännöllisesti. Kontrolliryhmän eläimiä on kohdeltava samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä, paitsi että niitä ei käsitellä testiaineella.

18. Annostason ja kantaja-aineen valinnan on perustuttava lähteissä 2 ja 19 esitettyihin suosituksiin. Peräkkäiset annostasot valitaan yleensä sopivasta konsentraatiosarjasta, esimerkiksi sarjasta 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ja niin edelleen. Käytettävälle konsentraatiosarjalle on esitettävä asianmukaiset tieteelliset perustelut. Kaikki käytettävissä olevat toksikologiset tiedot (esimerkiksi akuutti toksisuus ja ihoärsytys) ja rakenteelliset ja fysikaaliskemialliset tiedot kyseisestä testiaineesta (ja/tai rakenteellisesti vastaavista aineista) on tarvittaessa otettava huomioon kolmen peräkkäisen konsentraation valinnassa niin, että suurin konsentraatio edustaa maksimialtistusta, mutta koko elimistöön kohdistuva toksisuus ja/tai liian voimakas paikallinen ihoärsytys kuitenkin vältetään (19) (20 ja tämän liitteen B.4 luku). Jos tällaisia tietoja ei ole käytettävissä, testiä edeltävä kartoitus voi olla tarpeen (katso 21–24 kohta).

19. Kantaja-aine ei saa vaikuttaa testituloksiin tai vääristää niitä. Se on valittava siten, että testiaine liukenee siihen mahdollisimman helposti ja aineen konsentraatio annosteluun sopivassa liuoksessa tai suspensiossa on mahdollisimman suuri. Suositeltavat kantaja-aineet ovat asetoni:oliiviöljy (4:1 v/v), *N,N*-dimetyyliformamidi, metyylietyyliketoni, propyleeniglykoli ja dimetyylisulfoksidi (6), mutta muitakin kantaja-aineita voidaan käyttää riittävin tieteellisin perustein. Joissakin tilanteissa voi olla tarpeen käyttää lisäkontrolliaineena kliinisesti perusteltua liuotinta taikka kaupallista valmistetta, jona testiainetta markkinoidaan. Erityisesti on varmistettava, että hydrofiiliset testiaineet sisällytetään sellaiseen kantaja-ainejärjestelmään, joka vettää ihon eikä valu heti pois, lisäämällä asianmukaisia liukenemista edistäviä aineita (esimerkiksi 1-prosenttinen Pluronic® L92). Pelkkiä vesiliuoksia on siis syytä välttää.

▼M3

20. Prosessoimalla yksittäisten hiirten imusolmukkeita voidaan arvioida eläintenvälistä vaihtelua ja vertailla tilastollisesti testiaineen ja kantaja-aineella käsitellyn ryhmän tuloksia (katso 33 kohta). Positiivisen kontrolliryhmän hiirten määrän vähentäminen voi olla mahdollista, mutta vain siinä tapauksessa, että tietoja kerätään yksittäisistä eläimistä (17). Tietyt sääntelyviranomaiset vaativat, että tietoja on kerättävä yksittäisistä eläimistä. Yksittäisiä eläimiä koskevien tietojen keräämisellä edistetään eläinten hyvinvointia, koska siten vältetään päällekkäiset testaukset, jotka ovat tarpeen, jos sääntelyviranomaisten on tarkasteltava tietyllä tavalla (esimerkiksi eläimistä saatuja mittaustietoja yhdistämällä) saatuja testiainetuloksia myöhemmin muiden vaatimusten (esimerkiksi yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot) perusteella.

Testiä edeltävä kartoitus

21. Jos suurimman testattavan annoksen määrittämiseksi ei ole saatavilla tietoja (katso 18 kohta), on testiä ennen kartoitettava LLNA: BrdU-ELISA -menetelmän testeissä käytettävä asianmukainen annostaso. Siten autetaan enimmäisannoksen valinnassa varsinaista LLNA: BrdU-ELISA -tutkimusta varten, kun tietoja koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden (katso 24 kohta) ja/tai liian voimakkaan paikallisen ihoärsytyksen (katso 23 kohta) aiheuttavasta konsentraatiosta ei ole saatavilla. Testattavan enimmäisannoksen tason on vastattava sadan prosentin pitoisuutta nestemäisen testiaineen osalta tai suurinta mahdollista konsentraatiota kiinteiden tai suspendoitujen aineiden osalta.

22. Testiä edeltävä kartoitus suoritetaan varsinaista LLNA: BrdU-ELISA -tutkimusta vastaavissa olosuhteissa, kuitenkin niin, että imusolmukkeiden soluproliferaatiota ei arvioida, ja kussakin annosryhmässä voidaan käyttää vähemmän eläimiä. Kussakin annosryhmässä olisi hyvä käyttää yhtä tai kahta eläintä. Kaikkia hiiriä tarkkaillaan päivittäin koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden tai annostelukohdassa esiintyvän paikallisen ärsytyksen kliinisten merkkien havaitsemiseksi. Eläinten paino kirjataan ennen testaamista ja ennen eläinten lopettamista (päivä 6). Kunkin hiiren molemmista korvista tutkitaan eryteeman merkit, ja ne pisteytetään taulukon 1 mukaisesti (20 ja tämän liitteen B.4 luku). Korvan paksuus mitataan paksuusmittarilla (esimerkiksi digitaalisella mikrometrillä tai Peacock Dial -paksuusmittarilla) päivänä 1 (ennen annosta), päivänä 3 (noin 48 tunnin kuluttua ensimmäisestä annoksesta) ja päivänä 6. Päivänä 6 korvan paksuus voidaan myös määrittää mittaamalla korvan lävistämiseen tarvittava massa sen jälkeen, kun eläimet on lopetettu humaanisti. Paikallinen ärsytys on erittäin voimakas, jos eryteemapisteytyksen arvo $\geq$ 3 ja/tai korvan paksuuntuminen $\geq$ 25 prosenttia minä tahansa mittauspäivänä (21) (22). Suurin varsinaiseen LLNA: BrdU-ELISA -tutkimukseen valittava annos on kartoitusta varten määritetyn konsentraatiosarjan (katso 18 kohta) suurin annos, joka ei enää aiheuta koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä.

Taulukko 1

Eryteemapisteytys

Havainto	Pisteet
Ei eryteemaa	0
Hyvin lievä eryteema (tuskin havaittava)	1
Selkeästi erottuva eryteema	2

▼M3

Havainto	Pisteet
Keskivakava–vakava eryteema	3
Vakava eryteema (voimakas punoitus)–karsta, joka estää eryteeman pisteytyksen	4

23. Sen lisäksi, että käytetään korvien paksuuden lisääntymistä yli 25 prosenttia (21) (22), myös tilastollisesti merkittävää käsiteltyjen hiirten korvan paksuuden kasvua kontrollihiiriin verrattuna on käytetty ärsyttävien aineiden määrittämiseksi LLNA-menetelmässä (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Vaikka tilastollisesti merkittävää kasvua voi esiintyä silloinkin, kun korva paksuuntuu alle 25 prosenttia, sen ei katsota liittyvän erityisesti hyvin voimakkaaseen ärsytykseen (25) (26) (27) (28) (29).

24. Seuraavat kliiniset havainnot voivat yhdennetyn arvioinnin osana olla osoituksena koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta (30) ja voivat näin ollen olla osoituksena suurimmasta annostasosta, jota varsinaisessa LLNA: BrdU-ELISA -menetelmässä voidaan käyttää: muutokset hermoston toiminnassa (esimerkiksi karvojen jäykistyminen, ataksia, vapina ja kouristukset); muutokset käyttäytymisessä (esimerkiksi aggressiivisuus, muutokset turkin hoidossa, aktiivisuustason huomattava muuttuminen); muutokset hengityksessä (hengityksen säännöllisyyden ja syvyyden muutokset, kuten hengenahdistus, hengen haukkominen ja rahina) sekä muutokset ravinnon ja veden kulutuksessa. Arvioinnissa on huomioitava myös letargian ja/tai passiivisuuden merkit, vähäistä tai hetkittäistä kipua suuremman kivun ja kärsimyksen mahdolliset kliiniset merkit tai eläimen painon yli viiden prosentin laskeminen päivästä 1 päivään 6 sekä kuolleisuus. Kuolevat eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta kivusta ja kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti (31).

Varsinaisen tutkimuksen testiaikataulu

25. Määritysmenetelmän aikataulu on seuraava:

— *Päivä 1:* Määritetään ja kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään mahdollisia kliinisiä havaintoja. Kunkin korvan takaosaan annostellaan 25 µl testiaineen, kantaja-aineen tai positiivisen kontrollikemikaalin (rinnakkaisen tai hiljattain tehdyn, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat) sopivaa laimennosta.

— *Päivät 2 ja 3:* Toistetaan päivänä 1 toteutettu annostelu.

— *Päivä 4:* Ei käsittelyä.

— *Päivä 5:* Ruiskutetaan 0,5 ml (5 mg/hiiri) BrdU-liuosta (10 mg/ml) intraperitoneaalisesti.

— *Päivä 6:* Kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään mahdollisia kliinisiä havaintoja. Noin 24 tunnin (24 h) kuluttua BrdU-injektiosta eläimet lopetetaan humaanisti. Hiiren kummastakin korvasta leikataan irti dreneeraavat korvalehden imusolmukkeet, ja kunkin eläimen imusolmukkeet prosessoidaan erikseen fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS). Imusolmukkeiden tunnistukseen ja irrotukseen liittyvät tiedot ja kaaviot esitetään lähteessä (17). Paikallista ihovastetta voidaan seurata varsinaisessa tutkimuksessa tarkemmin niin, että tutkimussuunnitelmaan sisällytetään täydentäviä parametreja, kuten korvan eryteeman pisteytys tai korvan paksuutta koskevat mittaustulokset (saadaan joko paksuusmittarilla tai ruumiinavauksen yhteydessä tehtävillä korvan lävistämiseen tarvittavan massan mittauksilla).

▼M3

Solususpensioiden valmistus

26. Kunkin hiiren imusolmukeparien soluista valmistetaan suspensio, jossa kaikki solut ovat irrallaan muista (yksisolususpensio), hajottamalla kudos mekaanisesti painamalla se varovaisesti ruostumattoman terässeulan läpi (silmäkoko 200 μm) tai käyttämällä muuta yksisolususpension valmistamiseksi hyväksyttyä tekniikkaa (esimerkiksi käyttämällä kertakäyttöistä muovista survinta imusolmukkeiden murskaamiseen ja painamalla ne sitten nylonseulan läpi (silmäkoko 70)). Yksisolususpension valmistustapa on tässä määritysmenetelmässä erittäin tärkeä, ja menettely on opeteltava etukäteen. Negatiivisen kontrolliryhmän eläinten imusolmukkeet ovat pieniä, joten vaihe on suoritettava huolellisesti SI-arvoihin mahdollisesti vaikuttavien artefaktojen välttämiseksi. Kussakin menettelyssä yksisolususpension tilavuus on saatettava määritetyn optimoidun tilavuuden mukaiseksi (noin 15 ml). Optimoitu tilavuus perustuu negatiivisen kontrolliryhmän keskimääräiseen absorbanssiin välillä 0,1–0,2.

Solujen proliferaation määritys (lymfosyyttien DNA:n BrdU-pitoisuuden mittaaminen)

27. BrdU mitataan ELISA-menetelmällä käyttämällä kaupallisesti saatavilla olevaa välineistöä (esimerkiksi Roche Applied Science, Mannheim, Saksa, kataloginumero 11 647 229 001). Tasapohjaisen kuoppalevyn kuoppiin lisätään 100 μl imusolmukesolususpensiota kolmoismäärityksinä. Solususpension fiksaation ja denaturaation jälkeen jokaiseen kuoppaan lisätään anti-BrdU-vasta-aine ja sen annetaan reagoida. Tämän jälkeen anti-BrdU-vasta-aine poistetaan huuhtelemalla ja lisätään reaktion substraatti. Vapautuvan kromogeenin absorbanssi mitataan 370 nm:ssä ja 492 nm:n vertailuaallonpituudella. Määritysmenetelmän testiolosuhteet on kaikissa yhteyksissä optimoitava (katso 26 kohta).

HAVAINNOT

Kliiniset havainnot

28. Kustakin hiirestä on päivittäin havainnoitava huolellisesti mahdolliset kliiniset merkit joko annostelualueen paikallisesta ärsytyksestä tai koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti erikseen kustakin hiirestä. Seurantasuunnitelmissa on esitettävä myös perusteet, joiden avulla voidaan nopeasti tunnistaa hiiret, joissa havaitaan merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta, liian voimakkaasta paikallisesta ihoärsytyksestä tai ihosyövyttävyydestä ja jotka on lopetettava (31).

Ruumiinpainot

29. Kuten 25 kohdassa todetaan, kukin eläin on punnittava erikseen testin alussa ja aikataulun mukaisesti humaanin lopettamisen yhteydessä.

TULOSTEN LASKEMINEN

30. Kunkin käsittelyryhmän tulokset ilmoitetaan keskimääräisenä SI:nä. Sl-arvo saadaan jakamalla testiaineryhmän ja positiivisen kontrolliryhmän hiirikohtaisista BrdU-merkki-indekseistä laskettu keskiarvo liuottimen/kantaja-aineen kontrolliryhmän vastaavalla tuloksella. Kantaja-ainekontrollien SI:n keskiarvo on 1.

BrdU-merkki-indeksi määritellään seuraavasti:

$$\text{BrdU-merkki-indeksi} = (ABS_{em} - ABS\ blank_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ blank_{ref})$$

jossa: em = emissioaallonpituus; ja ref = referenssiaallonpituus.

▼M3

31. Tulos katsotaan positiiviseksi, kun SI ≥ 1,6 (10). Rajatuloksen (SI-arvo 1,6–1,9) positiivisuuden määrittämiseksi voidaan kuitenkin tarkastella myös annosvasteen voimakkuutta, tilastollista merkitsevyyttä sekä liuottimen/kantaja-aineen ja positiivisen kontrollikemikaalin vasteiden yhdenmukaisuutta (3) (6) (32).

32. Jos positiivisen rajavasteen SI on 1,6–1,9, käyttäjät voivat tulosten positiivisuuden vahvistamiseksi tarkastella SI-arvojen lisäksi myös muita tietoja, kuten annosvasteen voimakkuutta, merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta tai erittäin voimakkaasta ärsytyksestä ja tarvittaessa tilastollista merkittävyyttä (10). Lisäksi on syytä ottaa huomioon testiaineen erilaiset ominaisuudet, mukaan luettuina mahdolliset rakenteelliset yhtäläisyydet tunnettuihin ihoherkistystä aiheuttaviin aineisiin, sen hiirelle mahdollisesti aiheuttama erittäin voimakas ihoärsytys ja havaitun annosvasteen luonne. Näitä ja muita näkökohtia käsitellään yksityiskohtaisesti lähteessä (4).

33. Kun tiedot kerätään erikseen kustakin hiirestä, voidaan niiden perusteella analysoida tilastollisesti mahdollista annosvasteen voimakkuutta ja sen tasoa. Tilastoarvioinnissa voidaan myös arvioida annosvasteen voimakkuutta ja tehdä asianmukaisesti mukautettuja vertailuja testiryhmillä (esimerkiksi pareittain annoksen saaneen ryhmän vertailu samanaikaisesti tehtyyn liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmään). Tilastollisina analyyseina voidaan käyttää esimerkiksi lineaarista regressiota tai Williamin testiä, joilla arvioidaan annos-vastekehitystä, sekä Dunnettin testiä, jolla pareja vertaillaan toisiinsa. Tutkijan on otettava asianmukaisen tilastoanalyysimenetelmän valinnassa huomioon varianssien mahdolliset erot ja muut vastaavat ongelmat, jotka saattavat edellyttää määritystulosten muuntamista tai non-parametrista tilastoanalyysia. Tutkijan on kuitenkin mahdollisesti tehtävä SI-laskelmia ja tilastoanalyyseja sekä käyttäen tiettyjä määrityspisteitä koskevia tietoja (niin sanotut käyrän ulkopuolella olevat vasteet) että ilman niitä.

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Mittaustulokset

34. Tulokset on esitettävä taulukkona, josta käyvät ilmi eläinkohtaiset BrdU-merkki-indeksin arvot, ryhmän eläinkohtaisten BrdU-merkki-indeksien keskiarvo, siihen liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe) sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen SI samanaikaiseen liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmään verrattuna.

Loppuraportti

35. Loppuraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrollikemikaalit

— tunnistetiedot (esimerkiksi CAS- ja EC-numerot, jos tiedossa; alkuperä, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, eränumero),

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet (esimerkiksi haihtuvuus, stabiilisuus, liukoisuus),

— jos kyseessä on seos, sen koostumus ja ainesosien suhteelliset osuudet.

Liuotin/kantaja-aine

— tunnistetiedot (puhtaus, tarvittaessa konsentraatio, käytetty tilavuus),

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

▼**M3**

Koe-eläimet

— CBA-hiirten alkuperä,

— eläinten mikrobiologinen tila, jos se on tiedossa,

— eläinten määrä ja ikä,

— eläinten alkuperä, koe-eläintilat, ruokavalio ja niin edelleen.

Testiolosuhteet

— ELISA-välineistön alkuperä, erän numero ja valmistajan laadunvarmistus-/laadunvalvontatiedot (vasta-aineen herkkyys ja spesifisyys sekä osoitusraja),

— tiedot testiaineen valmistelusta ja annostelusta,

— perustelut annostasojen valinnalle (mukaan luettuina ennen testiä mahdollisesti suoritetun kartoituksen tulokset),

— käytetyt kantaja- ja testiaineiden konsentraatiot ja annostellun testiaineen kokonaismäärä,

— tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan luettuina ruokavalion tyyppi/alkuperä, veden alkuperä),

— tiedot käsittely- ja näytteenottoaikatauluista,

— toksisuuden mittausmenetelmät,

— tutkimusten positiivisuuden tai negatiivisuuden arviointiperusteet,

— tiedot menettelystä poikkeamisesta ja selvitys siitä, miten poikkeaminen vaikuttaa tutkimussuunnitelmaan ja tuloksiin.

Luotettavuuden tarkistus

— yhteenveto viimeisimmän luotettavuustarkistuksen tuloksista, mukaan luettuina tiedot käytetystä testiaineesta, konsentraatiosta ja kantaja-aineesta,

— testauslaboratorion samaan aikaan ja/tai aiemmin tehtyjen positiivisten ja samanaikaisten negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) kontrollien tulokset,

— jos testissä ei ollut samanaikaista positiivista kontrollia, viimeisimmän positiivisen kontrollin päivämäärä ja laboratorioraportti sekä yksityiskohtainen selvitys laboratorion aiemmista positiivista kontrollia koskevista tiedoista, joiden perusteella samanaikaista positiivista kontrollia ei tarvitsisi käyttää.

Tulokset

— kunkin hiiren paino annostelun alussa ja aikataulun mukaisen humaanin lopettamisen yhteydessä sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen virhetermi ja asiaan liittyviin muuttujiin liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe),

— toksisuuden ilmeneminen ajan funktiona ja toksisuuden merkit, mukaan luettuna mahdollinen annostelualueen ihoärsytys, erikseen kullekin eläinyksilölle,

— taulukko yksittäisten hiirten BrdU-merkki-indekseistä ja kunkin käsittelyryhmän SI-arvoista,

— kunkin käsittelyryhmän hiirikohtaisten BrdU-merkki-indeksien keskimääräinen virhetermi ja siihen liittyviin muuttujiin liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta ja keskiarvon keskivirhe) sekä käyrän ulkopuolella olevien vasteiden analyysin tulokset kullekin käsittelyryhmälle,

▼M3

— laskettu SI ja asianmukaisesti määritetty vaihteluväli, jossa otetaan huomioon eläintenvälinen vaihtelu, testiaineella ja kontrolliaineella käsitellyissä ryhmissä,

— annosvasteen voimakkuus,

— tarvittaessa tilastoanalyysit.

Tulosten pohdinta

— tulosten lyhyt kommentointi, annos-vasteanalyysi ja tarvittaessa tilastoanalyysi sekä johtopäätös siitä, onko testiainetta pidettävä ihoherkistystä aiheuttavana.

LÄHDELUETTELO

(1) OECD (2010). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) Chamberlain, M. ja Basketter, D. A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.* 34, s. 999–1002.

(3) Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. ja Loveless, S. E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.* 34, s. 985–997.

(4) Basketter, D. A., Gerberick, G. F. ja Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.* 36, s. 327–33.

(5) Van Och, F. M. M., Slob, W., De Jong, W. H., Vandebriel, R. J. ja Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.* 146, s. 49–59.

(6) ICCVAM (1999). The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH-julkaisunumero 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf

(7) Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G., Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34(3), s. 258–273.

(8) Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H., Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34(3), s. 274–286.

(9) Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N., Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34(3), s. 249–257.

(10) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH-julkaisunumero 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm

▼M3

(11) ICCVAM (2009). Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. ja Hoshuyama, S. (2005). Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.* 25, s. 129–134.

(13) OECD (1992). Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. ja Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.* 46, s. 1896–1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. ja Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 55, s. 90–96.

(16) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7. painos. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH-julkaisunumero 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa

http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf

(18) McGarry, H. F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.* 238, s. 71–89.

(19) Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes E. W. ja Basketter, D. A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.* 93, s. 13–31.

(20) OECD (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(21) Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L. ja DeGeorge, G. L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist* 96, s. 235.

(22) ICCVAM (2009). Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf.

(23) Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. ja Meade, B. J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.* 21, s. 195–206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. ja Vohr, V. W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, s. 83–94.

(25) Woolhiser, M. R., Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.* 8, s. 245–256.

▼**M3**

(26) Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.* 22, s. 491–506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A. O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. ja Vohr, H. W. (2005). A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.* 212, s. 60–68.

(28) Vohr, H. W. ja Ahr, H. J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.* 79, s. 721–728.

(29) Patterson, R. M., Noga, E. ja Germolec D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect. 115, s. 1023–1028.

(30) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm.

(31) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladies, G. S., Loveless, S. E. ja Hastings, K. L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ.l Health* 53, s. 563–79.

(33) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osa-tekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssia) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (33).

Vertailuaine: Herkistävä tai muu kuin herkistävä aine, jota käytetään testiaineen vertailustandardina. Vertailuaineella on oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana, ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testiaineryhmällä, iii) tunnetut fysikaaliskemialliset ominaisuudet, iv) todisteet tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellulla vasteen vaihteluvälillä.

Väärä negatiivinen: Testiaine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein negatiiviseksi tai inaktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on positiivinen tai aktiivinen (33).

Väärä positiivinen: Testiaine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein positiiviseksi tai aktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on negatiivinen tai inaktiivinen (33).

Vaarallisuus: Mahdollisuus kielteiseen terveys- tai ympäristövaikutukseen. Kielteinen vaikutus edellyttää altistumista vähintään tietyllä tasolla.

Laboratorioidenvälinen uusittavuus: Se, missä määrin eri (pätevät) laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samoja tutkimussuunnitelmia ja testaamalla samaa testiainetta. Laboratorioidenvälinen uusittavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyissä, ja sillä osoitetaan, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (33).

Laboratorionsisäinen uusittavuus: Se, missä määrin tietyn laboratorion pätevä henkilöstö voi saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimussuunnitelmaa eri ajankohtina (33).

Käyrän ulkopuolella oleva vaste: Käyrän ulkopuolella olevalla vasteella tarkoitetaan havaintoa, joka poikkeaa merkittävästi muista populaation sattumanvaraisten näytteiden arvoista.

Laadunvarmistus: Hallintomenettely, jossa testausta suorittavista henkilöistä riippumattomat henkilöt arvioivat laboratorion testausstandardien, vaatimusten ja kirjanpitomenettelyjen noudattamista ja tiedonsiirron tarkkuutta.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Se arvioidaan laskemalla uusittavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (33).

Ihoherkistys: Immunologinen prosessi, joka aiheutuu herkän yksilön paikallisesta altistamisesta tietylle kemialliselle allergeenille, joka aiheuttaa iholla immuunivasteen, joka voi johtaa kosketusherkistykseen.

Stimulaatioindeksi (SI): Testiaineen ihoärsytyspotentiaalin arvioimiseksi laskettu arvo, jolla esitetään käsiteltyjen ryhmien soluproliferaation ja samanaikaisen kantaja-aineella käsitellyn kontrolliryhmän soluproliferaation välinen suhde.

Testiaine (testikemikaali): Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

▼M4

B.52 AKUUTTI MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ – AKUUTIN TOKSISUUSLUOKAN MENETELMÄ

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 436 (2009). Ensimmäinen akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskeva testiohje nro 403 hyväksyttiin vuonna 1981, ja sitä on sen jälkeen tarkistettu (katso tämän liitteen luku B.2 (1)). Myrkyllinen hengitettynä -altistusta koskevan akuutin toksisuusluokan (ATC) menetelmän kehittäminen (2) (3) (4) katsottiin tarpeelliseksi sen jälkeen, kun tarkistettu akuutin toksisuusluokan menetelmä oli hyväksytty myrkyllinen suun kautta -altistusta varten (tämän liitteen luku B.1 b) (5). Akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevan akuutin toksisuusluokan testimenetelmän takautuva arviointi osoitti, että menetelmä sopii käytettäväksi luokitukseen ja merkintöihin liittyviin tarkoituksiin (6). Myrkyllisyyttä hengitettynä koskevan akuutin toksisuusluokan testimenetelmän avulla kiinteitä kohdepitoisuuksia voidaan käyttää vaiheittain testikemikaalin myrkyllisyyden luokittelemiseksi. Keskeinen tutkittava ominaisuus on kuolleisuus, mutta vakavasta kivusta tai tuskasta kärsivät tai kuolemaisillaan olevat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla kärsimyksen minimoimiseksi. Ohjeita eläinkokeiden humaaneista lopettamiskriteereistä on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 19 (7).

2. Tämän testimenetelmän mukaisten tutkimusten toteuttamista ja tulosten tulkintaa koskevat ohjeet ovat OECD:n ohjeasiakirjassa GD 39, jossa käsitellään akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevaa testausta (8).

3. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät ovat lisäyksessä 1 ja ohjeasiakirjassa GD 39 (8).

4. Testimenetelmä antaa tietoa vaarallisista ominaisuuksista, ja sen avulla testikemikaali voidaan määrittää ja luokitella akuuttia myrkyllisyyttä aiheuttavien kemikaalien luokittelua koskevan asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaisesti (9). Jos tarvitaan LC_{50}-arvojen piste-estimaatteja tai pitoisuus-vasteanalyyseja, on käytettävä tämän liitteen luvun B.2 (1) mukaista testimenetelmää. Lisätietoja testimenetelmän valinnasta on ohjeasiakirjassa GD 39 (8). Tätä testimenetelmää ei ole varsinaisesti tarkoitettu erikoismateriaalien, kuten huonosti liukenevien isometristen tai kuituisten materiaalien tai teollisesti valmistettujen nanomateriaalien testaukseen.

ALUSTAVAT HUOMIOT

5. Ennen tämän testimenetelmän mukaista testausta testauslaboratorion on hankittava kaikki saatavilla olevat tiedot testattavasta kemikaalista, mukaan luettuina olemassa olevat tutkimukset, joissa olevien tietojen ansiosta lisätestit voidaan jättää mahdollisesti tekemättä, jotta eläinten käyttö voidaan minimoida. Tietoihin, joista voi olla apua sopivimman lajin, kannan, sukupuolen, altistustavan ja asianmukaisten testipitoisuuksien valinnassa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -toksisuustestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus sekä saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista. Tällä testimenetelmällä ei tule testata pitoisuuksia, joiden odotetaan aiheuttavan vakavaa kipua ja kärsimystä syövyttävien ([1]) tai vaikeasti ärsyttävien vaikutusten vuoksi [katso ohjeasiakirja GD 39 (8)].

([1]) Syövyttävyyden arviointi voi perustua asiantuntijan lausuntoon, ja näyttönä voidaan käyttää esimerkiksi ihmisistä ja eläimistä saatuja tietoja, olemassa olevia (*in vitro* -) tietoja, kuten tämän liitteen lukua B.40 (10) ja B.40a tai OECD:n testiohjetta nro 435 (12), pH-arvoja, tietoja samanlaisista kemikaaleista tai muita asiaankuuluvia tietoja.

▼M4

TESTIN PERIAATE

6. Testin periaatteena on, että testikemikaalin akuutista myrkyllisyydestä hengitettynä kerätään riittävästi tietoa vaiheittaisen menettelyn avulla neljän tunnin pituisen altistusjakson aikana, jotta kemikaali voidaan luokitella. Myös muunpituisia altistuksia voidaan soveltaa tiettyihin sääntelytarkoituksiin. Jokaisessa määritetyn pitoisuuden vaiheessa testataan kolme eläintä kumpaakin sukupuolta. Sen mukaan, montako eläintä on kuollut ja/tai kuolemaisillaan, kaksi vaihetta voi riittää testikemikaalin akuutin myrkyllisyyden arvioimiseksi. Jos on näyttöä siitä, että toinen sukupuoli on toista herkempi, testiä voidaan jatkaa vain herkemmällä sukupuolella. Aiemman vaiheen tuloksen perusteella määritellään seuraava vaihe, joka on jokin seuraavista:

a) Lisätestausta ei tarvita.

b) On testattava kolme eläintä kumpaakin sukupuolta.

c) On testattava vain kuusi eläintä herkemmästä sukupuolesta, eli toksisuusluokan alarajan estimaattien on perustuttava kuuteen eläimeen testipitoisuusryhmää kohti sukupuolesta riippumatta.

7. Kuolemaisillaan olevat, selvästi kärsivät tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla, ja koetulosten tulkinnassa ne on otettava huomioon samalla tavalla kuin kokeessa kuolleet eläimet. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa GD 19 (7) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

8. On käytettävä terveitä, nuoria ja täysikasvuisia yleisesti käytettyjä koe-eläinkantoja. Suositeltavin laji on rotta, ja jos käytetään muita lajeja, sille on esitettävä perustelut.

Eläinten valmistelu

9. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Altistuspäivänä on käytettävä 8–12 viikon ikäisiä nuoria aikuisia eläimiä, joiden ruumiinpainon on oltava ± 20 prosenttia aiemmin altistettujen samanikäisten eläinten keskimääräisestä painosta kummankin sukupuolen osalta. Eläimet valitaan satunnaistetusti ja merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan. Eläimet pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Eläimet on totutettava myös testilaitteistoon vähän ennen testausta, sillä se vähentää uuteen ympäristöön tutustumisesta aiheutuvaa stressiä.

Eläinten hoito

10. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suhteellinen ilmankosteus on pidettävä mielellään 30–70 prosentin välillä, mikä ei välttämättä ole mahdollista, jos kantaja-aineena käytetään vettä. Ennen altistuksia ja niiden jälkeen eläimet on eroteltava häkkeihin sukupuolen ja pitoisuuden mukaisiin ryhmiin, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia, ja määrä on pidettävä sellaisena, että kannibalismista ja tappelusta johtuvat hävikit voidaan minimoida. Jos eläimet altistetaan vain nasaalisesti, ne voi olla tarpeen totuttaa immobilisointiputkiin. Immobilisointiputket eivät saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta fyysistä, lämpöön tai liikkumattomuuteen liittyvää stressiä. Immobilisointi voi vaikuttaa fysiologisiin

▼M4

tutkittaviin ominaisuuksiin, kuten ruumiinlämpöön (hypertermia) ja/tai hengityksen minuuttitilavuuteen. Jos saatavilla on rinnakkaistietoja, jotka osoittavat, ettei tällaisia muutoksia juuri ilmene, immobilisointiputkiin totuttaminen ei ole tarpeen. Eläimet, jotka altistetaan aerosolille kokonaan, on laitettava kokeen ajaksi häkkiin yksittäin, jotta testattava aerosoli ei suodatu muiden häkissä olevien eläinten karvapeitteen kautta. Tavallista ja sertifioitua laboratorioruokavaliota voidaan käyttää muulloin paitsi altistuksen aikana, eikä tavallisen juomaveden määrää tule rajoittaa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää).

Inhalaatiokammiot

11. Testikemikaalin luonne ja testin tavoite on otettava huomioon inhalaatiokammiota valittaessa. Ensisijainen altistumistapa on vain nasaalisesti (tähän termiin kuuluvat myös altistustavat vain pään kautta, vain nasaalisesti tai vain nokan kautta). Vain nasaalista altistusta suositellaan yleensä tutkittaessa nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja sekä sellaisia höyryjä, jotka saattavat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Tutkimuksen tietyt tavoitteet voidaan saavuttaa paremmin käyttämällä koko kehoon kohdistuvaa altistusta, mutta se on perusteltava tutkimusraportissa. Jotta kammion ilma voidaan pitää vakaana koko kehon kammiossa, koe-eläinten viemä tila saa olla korkeintaan viisi prosenttia kammion tilavuudesta. Vain nasaalisesti ja koko kehon kautta tapahtuvan altistuksen tekniikoiden periaatteet sekä niiden erityiset hyödyt ja haitat on kuvattu ohjeasiakirjassa GD 39 (8).

ALTISTUSOLOSUHTEET

Pitoisuuksien annostelu

12. Altistuksen kestoksi suositellaan kiinteää aikaa, joka on neljä tuntia, pois luettuna tasapainotilan saavuttamiseen kuluva aika. Muunpituiset altistukset voivat olla tarpeen tiettyjen vaatimusten täyttämiseksi, mutta tämä on perusteltava tutkimusraportissa [katso ohjeasiakirja GD 39 (8)]. Eläimille, joita altistetaan aerosoleille koko kehon kammioissa, on järjestettävä oma häkki sen estämiseksi, etteivät muut häkissä olevat eläimet niele testikemikaalia, kun ne hoitavat toistensa turkkia. Eläimiä ei saa ruokkia altistusjakson aikana. Vettä saa antaa koko kehoon kohdistuvan altistuksen ajan.

13. Eläimet altistetaan testikemikaalille, kun se on kaasuna, höyrynä, aerosolina tai niiden sekoituksena. Testattava fyysinen olomuoto määräytyy testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, valitun pitoisuuden ja/tai testikemikaalin käsittelyssä ja käytössä todennäköisen fyysisen muodon perusteella. Hygroskooppiset ja kemiallisesti reaktiiviset testikemikaalit on testattava kuivaa ilmaa käyttäen. Räjähtävien pitoisuuksien tuottamista on vältettävä huolellisesti.

Hiukkaskokojakauma

14. Hiukkasten koko on mitattava kaikista aerosoleista ja sellaisista höyryistä, jotka voivat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Jotta kaikki hengityselimistön oleelliset osat altistuvat aineelle, on suositeltavaa käyttää aerosoleja, joiden massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) on 1–4 μm ja joiden geometrinen keskihajonta (σ_g) sijoittuu välille 1,5–3,0 (8) (13) (14). Tämä vaatimus on pyrittävä täyttämään kaikin keinoin, mutta jos se ei onnistu, on esitettävä asiantuntijan lausunto. Esimerkiksi metallihuurut voivat olla tätä vaatimusta pienempiä, kun taas varautuneet hiukkaset, kuidut ja hygroskooppiset materiaalit (joiden koko kasvaa hengitystie-elimistön kosteassa ympäristössä) voivat olla vaatimusta suurempia.

▼M4

Testikemikaalin valmistelu kantaja-aineessa

15. Jotta ilmakehään saadaan testikemikaalista sopiva pitoisuus ja hiukkaskoko, voidaan käyttää kantaja-ainetta. Pääsääntöisesti on käytettävä vettä. Hiukkasmateriaaleja voidaan joutua käsittelemään mekaanisesti vaaditun hiukkaskokojakauman saavuttamiseksi, mutta se on tehtävä varovasti, jotta testikemikaali ei hajoa tai muutu. Jos mekaanisen prosessin oletetaan muuttaneen testikemikaalin koostumusta (esimerkiksi kitkan vuoksi liiallisen jauhamisen aiheuttamat hyvin korkeat lämpötilat), testikemikaalin koostumus on varmennettava analyyttisesti. Riittäviä varotoimia on noudatettava, jotta testikemikaali ei kontaminoidu. Murenemattomia raemateriaaleja, jotka on tarkoituksella valmistettu sellaisiksi, ettei niitä voi hengittää, ei tarvitse testata. Hankauskoe on tehtävä sen osoittamiseksi, ettei raemaisen materiaalin käsittelyssä synny hengitettäviä hiukkasia. Jos hankauskoe tuottaa hengitettäviä hiukkasia, on tehtävä sisäänhengityksen kautta aiheutuvaa myrkyllisyyttä koskeva testi.

Verrokkieläimet

16. Samanaikaista negatiivista (ilma-) verrokkiryhmää ei tarvita. Jos testi-ilmakehän tuottamisessa käytetään apuna muuta kantaja-ainetta kuin vettä, kantaja-aineverrokkiryhmää on käytettävä ainoastaan silloin, kun saatavilla ei ole aiempia tietoja sisäänhengityksen kautta aiheutuvasta myrkyllisyydestä. Jos kantaja-aineessa valmistellun testikemikaalin myrkyllisyystutkimus osoittaa, ettei kemikaali ole myrkyllinen, se tarkoittaa, että kantaja-aine on myrkytön testattuna pitoisuutena, joten kantaja-aineverrokkia ei tarvita.

ALTISTUSOLOSUHTEIDEN SEURANTA

Kammion ilmavirtaus

17. Ilman virtausta kammion läpi on valvottava tarkasti ja seurattava jatkuvasti, ja sitä koskevat tiedot on kirjattava vähintään kerran tunnissa jokaisen altistuksen aikana. Testi-ilmakehän pitoisuuden (tai stabiiliuden) seuranta kuuluu olennaisena osana kaikkien dynaamisten parametrien mittaamiseen, ja se on myös epäsuora keino valvoa kaikkia oleellisia dynaamisia parametreja, joita tarvitaan ilmakehän tuottamiseen. Erityistä huomiota on kiinnitettävä siihen, että uudelleenhengittäminen vältetään vain nasaalisen altistuksen kammioissa niissä tapauksissa, kun altistusjärjestelmän läpi kulkeva ilmavirtaus ei riitä tuottamaan dynaamista testikemikaali-ilmakehän virtaa. On tiettyjä menetelmiä, joita voidaan käyttää osoittamaan, ettei valituissa toimintaolosuhteissa tapahdu uudelleenhengittämistä (8) (15). Happipitoisuuden on oltava vähintään 19 prosenttia, eikä hiilidioksidipitoisuus saa ylittää yhtä prosenttia. Jos on aihetta olettaa, ettei näitä vaatimuksia voida täyttää, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet on mitattava.

Kammion lämpötila ja suhteellinen kosteus

18. Kammion lämpötila on pidettävä välillä 22 ± 3 °C. Eläinten hengitysilman suhteellista kosteutta on seurattava sekä nasaalisissa että koko kehoon kohdistuvissa altistuksissa, ja se on kirjattava vähintään kolmesti enintään neljä tuntia kestävien altistusten osalta ja tunneittain lyhyempien altistusten osalta. Suhteellisen kosteuden tulisi olla välillä 30–70 prosenttia, mutta tämä ei ole välttämättä mahdollista (esimerkiksi testattaessa vesipohjaisia seoksia) tai mitattavissa, koska testikemikaali häiritsee testimenetelmää.

▼M4

Testikemikaali: nimellispitoisuus

19. Aina kun mahdollista, altistuskammion nimellispitoisuus on laskettava ja kirjattava. Nimellispitoisuus on tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammiojärjestelmän läpi virtaavan ilman kokonaistilavuudella. Nimellispitoisuudella ei luonnehdita eläinten altistumista, vaan nimellispitoisuuden ja varsinaisen pitoisuuden vertailusta saadaan tietoa testijärjestelmän generointitehokkuudesta, ja sitä voidaan siis käyttää generointiongelmien havaitsemiseen.

Testikemikaali: varsinainen pitoisuus

20. Todellinen pitoisuus on testikemikaalin pitoisuus eläinten hengitysilmassa inhalaatiokammiossa. Todelliset pitoisuudet saadaan tietyillä menetelmillä (esimerkiksi suoralla näytteenotolla, adsorptiivisilla tai kemiallisesti reaktiivisilla menetelmillä ja tulosten analyyttisella luonnehtimisella) tai muilla menetelmillä, kuten suodatukseen perustuvalla gravimetrisella analyysilla. Gravimetrisen analyysin käyttö on hyväksyttävää vain yksikomponenttisten jauhemaisten aerosolien tai heikosti haihtuvista nesteistä koostuvien aerosolien yhteydessä, ja sitä on tuettava asianmukaisella esitutkimuksella, jossa käsitellään testikemikaalia koskevia luonnehdintoja. Monikomponenttisten jauhemaisten aerosolien pitoisuus voidaan myös määrittää gravimetrisen analyysin avulla. Siihen tarvitaan kuitenkin analyysitietoja, jotka osoittavat, että ilmassa leijuvan materiaalin koostumus on sama kuin lähtömateriaalin. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, testikemikaali voi olla tarpeen analysoida uudelleen (mieluiten ilmassa leijuvassa muodossaan) säännöllisin väliajoin tutkimuksen aikana. Sellaisten aerosolisoituvien aineiden osalta, jotka voivat höyrystyä tai sublimoitua, on osoitettava, että valitulla menetelmällä kerättiin kaikki faasit. Tutkimusraportissa on ilmoitettava tavoitepitoisuus, nimellinen pitoisuus ja todellinen pitoisuus, mutta tilastollisissa analyyseissa käytetään vain todellisia pitoisuuksia tappavien pitoisuuksien arvoja laskettaessa.

21. Jos mahdollista, on käytettävä yksi erä testikemikaalia, ja testinäyte on säilytettävä sen puhtauden, homogeenisuuden ja stabiiliuden säilyttävissä olosuhteissa. Ennen tutkimuksen aloittamista testikemikaalista on laadittava luonnehdinta, johon on sisällyttävä sen puhtaus ja – mikäli teknisesti mahdollista – identiteetti sekä tunnistettujen kontaminanttien ja epäpuhtauksien määrät. Tämä voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavien tietojen avulla: retentioaika ja piikin suhteellinen pinta-ala sekä molekyylipaino, joka on saatu massaspektroskopialla tai kaasukromatografia-analyyseista, tai muut estimaatit. Vaikka testinäytteen identiteetti ei kuulu testauslaboratorion vastuulle, sen voi olla järkevää vahvistaa rahoittajan laatima luonnehdinta ainakin tietyssä määrin (esimerkiksi väri, fysikaalinen olomuoto jne.).

22. Altistusilmakehä on pidettävä mahdollisimman muuttumattomana, ja sitä on tarkkailtava jatkuvasti ja/tai ajoittain analyysimenetelmän mukaisesti. Jos näytteitä otetaan ajoittain, kammion ilmakehästä on otettava näytteitä vähintään kahdesti neljän tunnin tutkimuksen aikana. Jos se ei ole mahdollista vähäisen ilmanvirtauksen tai pienten pitoisuuksien vuoksi, koko altistusjakson ajalta voidaan ottaa yksi näyte. Jos näytteiden välillä ilmenee suurta vaihtelua, seuraavia pitoisuuksia testattaessa on otettava neljä näytettä kutakin altistusta kohti. Yksittäiset kammion pitoisuusnäytteet eivät saa poiketa keskimääräisestä pitoisuudesta enempää kuin enintään ± 10 prosenttia kaasujen ja höyryjen osalta tai enintään ± 20 prosenttia nestemäisten tai kiinteiden aerosolien osalta. Kammion tasapainotukseen kulunut aika (t_{95}) on laskettava ja kirjattava. Altistuksen kesto käsittää ajan, jolloin testikemikaali muodostetaan, mikä otetaan huomioon t_{95}-ajan saavuttamiseen tarvittavissa ajoissa. Ohjeita t_{95}-ajan arvioimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 39 (8).

▼M4

23. Hyvin monimutkaisten, kaasuista/höyryistä koostuvien seosten ja aerosolien (esimerkiksi polttokammiot ja tietyn tarkoituksen mukaisten lopputuotteiden/-laitteiden perusteella kehitetyt testikemikaalit) osalta kukin faasi voi käyttäytyä inhalaatiokammiossa eri tavoin, joten jokaisesta faasista (kaasu/höyry ja aerosoli) on valittava vähintään yksi indikaattoriaine (analyytti), yleensä seoksen pääasiallinen vaikuttava aine. Kun testikemikaali on seos, on ilmoitettava seoksen analyyttinen pitoisuus, ei siis pelkästään vaikuttavan aineen tai komponentin (analyytin) pitoisuutta. Lisätietoja todellisista pitoisuuksista on ohjeasiakirjassa GD 39 (8).

Testikemikaali: hiukkaskokojakauma

24. Aerosolien hiukkaskokojakauma on määritettävä vähintään kahdesti jokaisen neljän tunnin mittaisen altistuksen aikana käyttämällä kaskadierotinta tai jotain toista laitetta, kuten aerodynaamista hiukkaskokoluokittelijaa. Jos kaskadierottimella tai muulla laitteella saatujen tulosten välinen vastaavuus voidaan osoittaa, kyseistä muuta laitetta voidaan käyttää koko tutkimuksen ajan. Ensisijaisen laitteen rinnalla on käytettävä toissijaista laitetta, esimerkiksi gravimetrista suodatinta tai törmäytintä/kuplituslaitetta ensisijaisen laitteen keräystehon vahvistamiseksi. Hiukkaskoon analyysista saadun massapitoisuuden on sijoituttava kohtuullisessa määrin suodatusanalyysilla saadun massapitoisuuden rajoihin [katso GD 39 (8)]. Jos vastaavuus voidaan osoittaa tutkimuksen varhaisessa vaiheessa, myöhemmät vahvistavat mittaukset voidaan jättää tekemättä. Eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä tietojen epävarmuus on pyrittävä minimoimaan, jotta altistusta ei tarvitse toistaa. Höyryjen osalta on määritettävä hiukkaskoko, jos on mahdollista, että höyryn tiivistyessä muodostuu aerosolia, tai jos höyrykammiossa, jossa faasien sekoittuminen on mahdollista, havaitaan hiukkasia (katso 14 kohta).

MENETTELY

Päätutkimus

25. Jokaisessa vaiheessa käytetään kolmea eläintä kumpaakin sukupuolta tai kuutta eläintä herkemmästä sukupuolesta. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Aloitusannoksena käytettävä pitoisuus valitaan 1–4 kiinteästä pitoisuustasosta. Aloituspitoisuuden on oltava sellainen, että se todennäköisimmin aiheuttaa myrkyllisiä vaikutuksia joillekin eläimistä, joille testikemikaalia on annettu. Kaasujen, höyryjen ja aerosolien testausmalleissa testataan CLP-luokkien 1–4 raja-arvoilla, jotka ovat kaasujen osalta 100, 500, 2 500 ja 20 000 ppm/4h (lisäys 2), höyryjen osalta 0,5, 2, 10 ja 20 mg/l/4h (lisäys 3) ja aerosolien osalta 0,05, 0,5, ja 1,5 mg/l/4h (lisäys 4). Luokka 5, jota ei käytetä asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 (9), koskee pitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin kyseiset rajapitoisuudet. Jokaisen aloituspitoisuuden osalta sovelletaan vastaavaa testausmallia. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleiden eläinten lukumäärän mukaan testimenettelyssä edetään merkittyjen nuolten mukaisesti, kunnes luokitus voidaan tehdä.

26. Altistusryhmien välinen aika määritellään toksisten oireiden alkamishetken, keston ja vaikeusasteen mukaan. Eläinten altistusta seuraavalla pitoisuudella on lykättävä, kunnes on saatu riittävä varmuus jo testattujen eläinten eloonjäämisestä. Kunkin pitoisuustason välissä on suositeltavaa pitää kolmen tai neljän päivän mittainen tauko, jotta voidaan tarkkailla, ilmenevätkö myrkyllisyyden merkit viipeellä. Aikaväliä voidaan tarvittaessa mukauttaa esimerkiksi epävarmojen vasteiden yhteydessä.

▼M4

Rajatesti

27. Rajatestiä käytetään silloin, kun testikemikaalin tiedetään tai oletetaan olevan periaatteessa myrkytön eli aiheuttavan toksisen vasteen vain lakisääteistä rajapitoisuutta suuremmilla pitoisuuksilla. Tietoa testikemikaalin myrkyllisyydestä voidaan hankkia samanlaisia testattuja kemikaaleja koskevista tiedoista, jolloin on otettava huomioon niiden komponenttien identiteetti ja prosenttiosuus, joilla tiedetään olevan toksikologista merkitystä. Tilanteissa, joissa tietoa testikemikaalin myrkyllisyydestä on vain vähän tai sitä ei ole lainkaan tai jos testikemikaalin oletetaan olevan myrkyllinen, on toteutettava päätutkimus [lisäohjeita on ohjeasiakirjassa GD 39 (8)].

28. Normaalissa menettelyssä kolme eläintä kumpaakin sukupuolta tai kuusi eläintä herkemmästä sukupuolesta altistetaan pitoisuuksille, jotka ovat kaasujen osalta 20 000 ppm, höyryjen osalta 20 mg/l ja pölyjen/sumutteiden osalta 5 mg/l (mikäli saavutettavissa), mikä katsotaan tässä testimenetelmässä rajatestiksi. Aerosolien testauksessa ensisijaisena tavoitteena tulee olla hengitettävän hiukkaskoon (MMAD 1–4 μm) saavuttaminen. Useimpien kemikaalien osalta tämä on mahdollista, kun niiden pitoisuus on 2 mg/l. Aerosolien testaamista suurempina pitoisuuksina kuin 2 mg/l on yritettävä vain, jos hengitettävä hiukkaskoko voidaan saavuttaa [katso GD 39 (8)]. GHS-järjestelmän (16) mukaan rajapitoisuuden ylittävien testien tekeminen ei ole suositeltavaa eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä GHS-järjestelmän luokan 5 (16), jota ei käytetä asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 (9), mukaista testausta tulee harkita vain, jos on erittäin todennäköistä, että tällaisen testin tulokset ovat suoraan merkityksellisiä ihmisten terveyden suojelemisessa, ja se on perusteltava tutkimusraportissa. Mahdollisesti räjähtäviä testikemikaaleja on käsiteltävä varovasti räjähdykselle suotuisien olosuhteiden välttämiseksi. Jotta vältetään eläinten tarpeeton käyttö, ennen rajatestiä on tehtävä testiajo ilman eläimiä sen varmistamiseksi, että rajatestin edellyttämät kammio-olosuhteet voidaan saavuttaa.

HAVAINNOT

29. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti ja säännöllisesti altistumisjakson aikana. Altistuksen jälkeen kliinisiä havaintoja on tehtävä vähintään kahdesti altistuspäivän aikana tai useammin, jos eläinten vaste käsittelyyn antaa siihen aihetta, ja vähintään kerran päivässä sen jälkeen yhteensä 14 päivän ajan. Havaintojakson pituus ei ole kiinteä, vaan se on määritettävä kliinisten merkkien luonteen ja alkamisajankohdan sekä toipumisajan pituuden perusteella. Ne ajankohdat, jolloin myrkyllisyyden merkit ilmaantuvat ja häviävät, ovat tärkeitä varsinkin, jos myrkyllisyyden merkit ilmaantuvat viipeellä. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti jokaisesta eläimestä erikseen. Kuolevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet ja/tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti eläinten hyvinvointiin liittyvien periaatteiden vuoksi. Kun tutkitaan myrkyllisyyden kliinisiä merkkejä, on kiinnitettävä huomiota siihen, ettei altistusmenettelystä johtuvaa huonoa ulkonäköä ja ohimeneviä muutoksia hengityksessä pidetä erehdyksessä merkkeinä kemikaaliin liittyvästä myrkyllisyydestä. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa ohjeasiakirjassa esitetyt periaatteet ja perustelut on otettava huomioon (7). Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

▼M4

30. Häkin vieressä tehtyihin havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, autonomisen hermoston ja keskushermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Mikäli mahdollista, paikallisten ja systeemisten vaikutusten väliset erot on merkittävä muistiin. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljeneritykseen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Lämmön mittaaminen peräsuolesta voi antaa tukevaa näyttöä refleksinomaisesta bradypneasta tai käsittelyyn tai ahtaaseen tilaan liittyvästä tai hypo-/hypertermiasta.

Eläinten painot

31. Kunkin eläimen paino on kirjattava kerran sopeutumisvaiheen aikana, altistuspäivänä ennen altistusta (päivä 0) ja vähintään päivinä 1, 3 ja 7 (ja myöhemmin viikoittain) sekä kuolinhetkellä tai lopettamisen yhteydessä, jos se tapahtuu päivän 1 jälkeen. Ruumiinpaino on tunnetusti erittäin tärkeä myrkyllisyyden indikaattori, joten eläimiä, joiden paino on jatkuvasti vähintään 20 prosenttia pienempi ennen tutkimusta mitattuihin arvoihin verrattuna, on seurattava tarkasti. Elossa olevat eläimet punnitaan ja lopetetaan humaanisti altistumisen jälkeisen jakson lopussa.

Patologia

32. Kaikki koe-eläimet, myös kokeen aikana kuolleet tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi lopetetut ja tutkimuksesta poistetut, avataan. Jos avausta ei voida tehdä heti kuolleen eläimen löytämisen jälkeen, eläintä on säilytettävä riittävän kylmässä lämpötilassa (ei pakastimessa) autolyysin minimoimiseksi. Ruumiinavaukset on tehtävä mahdollisimman pian, yleensä yhden tai kahden päivän kuluessa. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata, ja erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteissä oleviin muutoksiin.

33. Myös tutkimussuunnitelmaan ennalta sisällytettyjen lisätutkimusten käyttöä voidaan harkita tutkimuksen tulkinnallisen arvon lisäämiseksi. Tällaisia tutkimuksia ovat esimerkiksi eloonjääneiden rottien keuhkojen painon punnitus ja/tai todisteiden hankkiminen ärsyttävyydestä hengitysteiden mikroskooppitutkimuksella. Tutkittaviin elimiin voi sisältyä myös vähintään 24 tuntia hengissä säilyneiden eläinten makroskooppisia muutoksia sisältävät elimet ja elimet, joissa tiedetään tai oletetaan olevan kemikaalin aiheuttamia vaikutuksia. Koko hengityselimistön mikroskooppitutkimus voi antaa hyödyllistä tietoa veden kanssa reagoivista testikemikaaleista, kuten hapoista ja hygroskooppisista testikemikaaleista.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

34. Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot ruumiinpainoista ja ruumiinavaustuloksista on esitettävä. Kliiniset havaintotiedot tulee esittää yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin testiryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, myrkyllisyyden oireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, myrkyllisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset.

▼M4

Testiraportti

35. Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet ja niiden hoito

— kuvaus häkkiolosuhteista, mukaan luettuina seuraavat tiedot: yhdessä häkissä olevien eläinten lukumäärä (tai lukumäärän muutos), alustamateriaali, lämpötila ja suhteellinen kosteus, valoisa aika ja tiedot ravinnosta

— käytetyt lajit/kanta ja perustelu muun lajin kuin rotan käyttämiselle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— satunnaistamismenetelmä

— tiedot ruoan ja veden laadusta (sekä ravinnon tyyppi/lähde, veden lähde)

— kuvaus testiä edeltäneestä tilanteesta ja tiedot ravinnosta, karanteenista ja sairauden hoidosta.

Testikemikaali

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (mukaan luettuna isomeria)

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään.

Kantaja-aine

— perustelut kantaja-aineen käyttämiselle ja sen valinnalle (jos se on muu kuin vesi)

— aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saadut tiedot, jotka osoittavat, ettei kantaja-aine vaikuta tutkimuksen tulokseen.

Inhalaatiokammio

— kuvaus inhalaatiokammiosta sekä sen mitat ja tilavuus

— kuvaus eläinten altistukseen ja ilmakehän tuottamiseen käytetystä laitteistosta ja sen alkuperä

— lämmön, kosteuden, hiukkaskoon ja todellisen pitoisuuden mittauslaitteet

— ilmanlähde, tulo- ja poistoilman käsittely sekä ilmanvaihtojärjestelmä

— menetelmät, joilla laitteisto on kalibroitu yhtenäisen testi-ilmakehän varmistamiseksi

— paine-ero (yli- vai alipaine)

— kunkin kammion altistusportit (vain nasaalinen altistus); eläinten sijainti järjestelmässä (koko kehoon kohdistuva altistus)

— testi-ilmakehän ajallinen yhtenäisyys/stabiilius

— lämpötila- ja kosteusantureiden sekä testi-ilmakehän näytteenottopaikan sijainti kammiossa

— ilman virtausnopeudet, ilman virtausnopeus kussakin altistusportissa (vain nasaalinen altistus) tai eläinkuorma/kammio (koko kehoon kohdistuva altistus)

— tiedot hapen ja hiilidioksidin mittauslaitteistosta, jos tarpeen

▼**M4**

— inhalaatiokammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95})

— tilavuusmuutosten määrä tunneittain

— annostelulaitteet (tarvittaessa).

Altistustiedot

— päätutkimuksen tavoitepitoisuuden valinnan peruste

— nimellispitoisuudet (altistuskammioon tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammion läpi virtaavan ilman tilavuudella)

— eläinten hengitysilmasta kerätyt testikemikaalin todelliset pitoisuudet; epäyhtenäisiä fyysisiä muotoja (kaasuja, höyryjä, aerosoleja) tuottavien seosten osalta jokainen voidaan analysoida erikseen

— kaikki ilmapitoisuudet on ilmoitettava massayksikköinä (esimerkiksi mg/l, mg/m^3, jne.), tilavuusyksiköt (esimerkiksi ppm, ppb jne.) voidaan ilmoittaa sulkeissa

— hiukkaskokojakauma, massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (σg) sekä niiden laskentamenetelmät. Yksittäiset hiukkaskokoanalyysit on myös esitettävä.

Testiolosuhteet

— tiedot testikemikaalin valmistelusta, mukaan luettuina tiedot kiinteiden materiaalien hiukkaskoon pienentämisessä tai testikemikaaliliuosten valmistamisessa käytetyistä menetelmistä. Jos mekaaniset prosessit ovat voineet muuttaa kemiallista koostumusta, on ilmoitettava analyysien tulokset testikemikaalin koostumuksen vahvistamiseksi.

— kuvaus (mieluiten kaavio) testi-ilmakehän tuottamiseen ja eläinten altistamiseen testi-ilmakehälle käytetystä laitteistosta

— tiedot käytetystä kemiallisesta analyysimenetelmästä ja sen validointimenetelmästä (myös tiedot siitä, miten tehokasta testikemikaalin saanto oli näytteenottokohdasta)

— testipitoisuuksien valintaperuste.

Tulokset

— kammion lämpötila, kosteus ja ilmanvirtaus (taulukkomuodossa)

— tiedot nimellisistä ja todellisista pitoisuuksista kammiossa (taulukkomuodossa)

— hiukkaskokotiedot sekä analyyttiset tiedot näytteen keräämisestä, hiukkaskokojakaumasta ja MMAD-arvon ja σ_g-arvon laskelmat (taulukkomuodossa)

— vastetiedot ja pitoisuustaso jokaisesta eläimestä (ts. eläimet, joissa oli merkkejä myrkyllisistä vaikutuksista, ja tiedot kuolleisuudesta sekä vaikutusten luonteesta, vaikeusasteesta, alkamisajankohdasta ja kestosta) (taulukkomuodossa)

— tutkimuksen aikana kerätyt tiedot yksittäisten eläinten ruumiinpainoista, kuolinpäivä ja -aika, jos se tapahtui ennen suunniteltua lopetusta, kunkin eläimen myrkyllisyysoireiden alkamisajankohta ja niiden mahdollinen palautuminen

▼M4

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla

— CLP-luokitus ja LC_{50}-raja-arvo.

Tulosten pohdinta ja tulkinta

— On kiinnitettävä erityistä huomiota niiden menetelmien kuvaukseen, joita tämän testimenetelmän vaatimusten (esimerkiksi rajapitoisuus tai hiukkaskoko) täyttämisessä käytettiin.

— Hiukkasten hengitettävyyttä on käsiteltävä kaikkien löydösten kannalta etenkin, jos hiukkaskokoon liittyvää kriteeriä ei voitu täyttää.

— Tutkimuksen kokonaisarviointiin on sisällytettävä tiedot nimellisten ja todellisten pitoisuuksien määrittelemiseen käytettyjen menetelmien yhtenäisyydestä sekä todellisen ja nimellisen pitoisuuden suhde.

— Raportissa on käsiteltävä myös todennäköistä kuolinsyytä ja pääasiallisesta vaikutustavasta (systeeminen vs. paikallinen).

— Jos kärsiviä tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavia eläimiä oli lopetettava humaanisti eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (7) olevien perustelujen mukaisesti, siitä on esitettävä selvitys.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Tämän liitteen luku B.2 – Akuutti myrkyllisyys hengitettynä.

2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243–254.

3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537–549.

4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129–134.

5) Tämän liitteen luku B.1 b: Akuutti myrkyllisyys hengitettynä – akuutin toksisuuden luokittelua koskeva menetelmä

6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

10) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* ihosyövyttävyys: Ihon sähkövastusmääritystesti (TER).

11) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* ihosyövyttävyys: Ihmisihomallitesti.

12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321–327.

15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

Lisäys 2

Kaasut: jokaisen aloituspitoisuuden (PPM/4 H) yhteydessä noudatettava menettely

Yleisiä huomioita ([1])

Jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä on noudatettava tässä lisäyksessä olevan testimallin mukaista menettelyä.

Lisäys 2 a: Aloituspitoisuus on 100 ppm.

Lisäys 2 b: Aloituspitoisuus on 500 ppm.

Lisäys 2 c: Aloituspitoisuus on 2 500 ppm.

Lisäys 2 d: Aloituspitoisuus on 20 000 ppm.

Testimenetelmässä edetään merkittyjen nuolten mukaisesti sen mukaan, kuinka monta eläintä on lopetettu humaaneista syistä tai kuinka monta eläintä on kuollut.

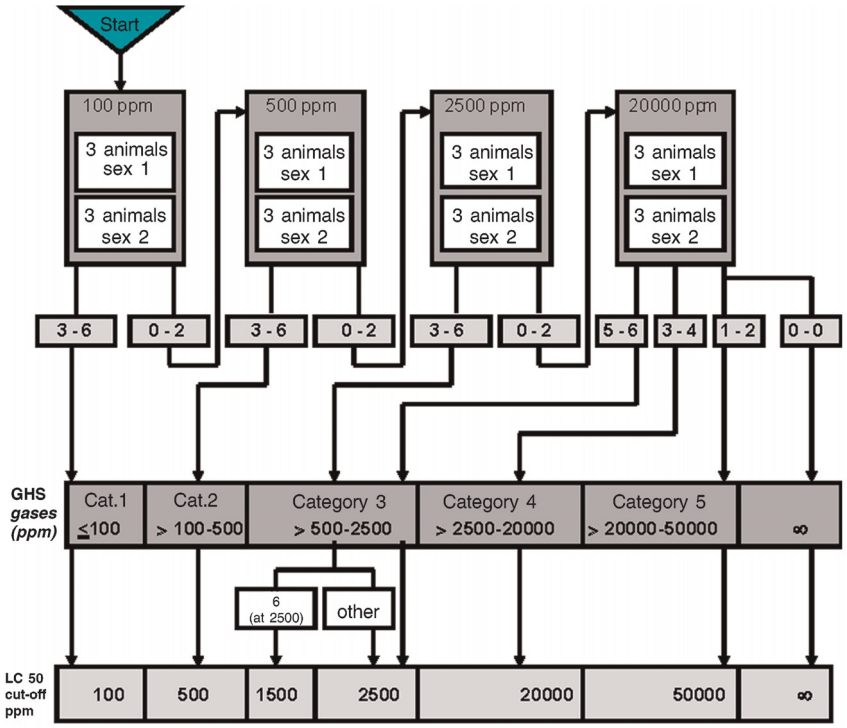
([1]) Seuraavissa taulukoissa tarkoitetaan yhdenmukaistettua kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmää (GHS). EU:ssa sitä vastaa asetus (EY) N:o 1272/2008. Akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä tutkittaessa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 ei käytetä luokkaa 5.

▼M4

Lisäys 2 a

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 100 ppm/4 h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

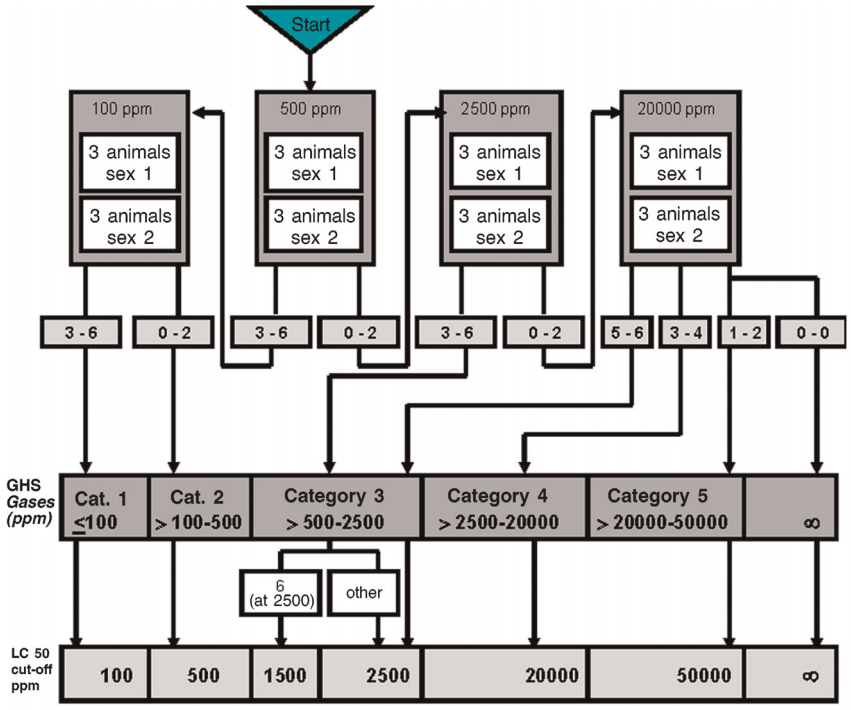
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 2 b

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

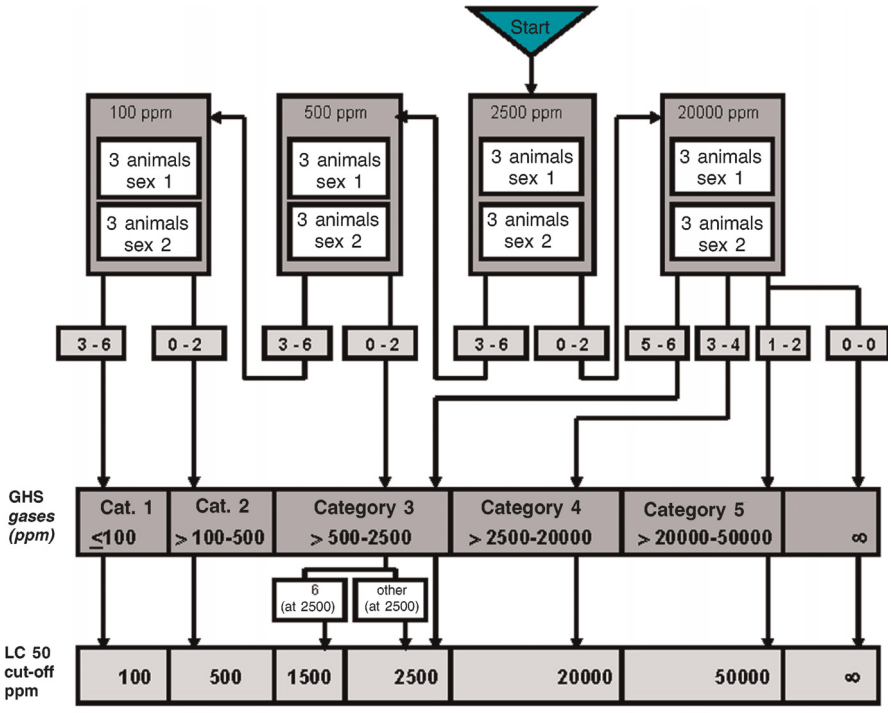
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 2 c

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 2 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

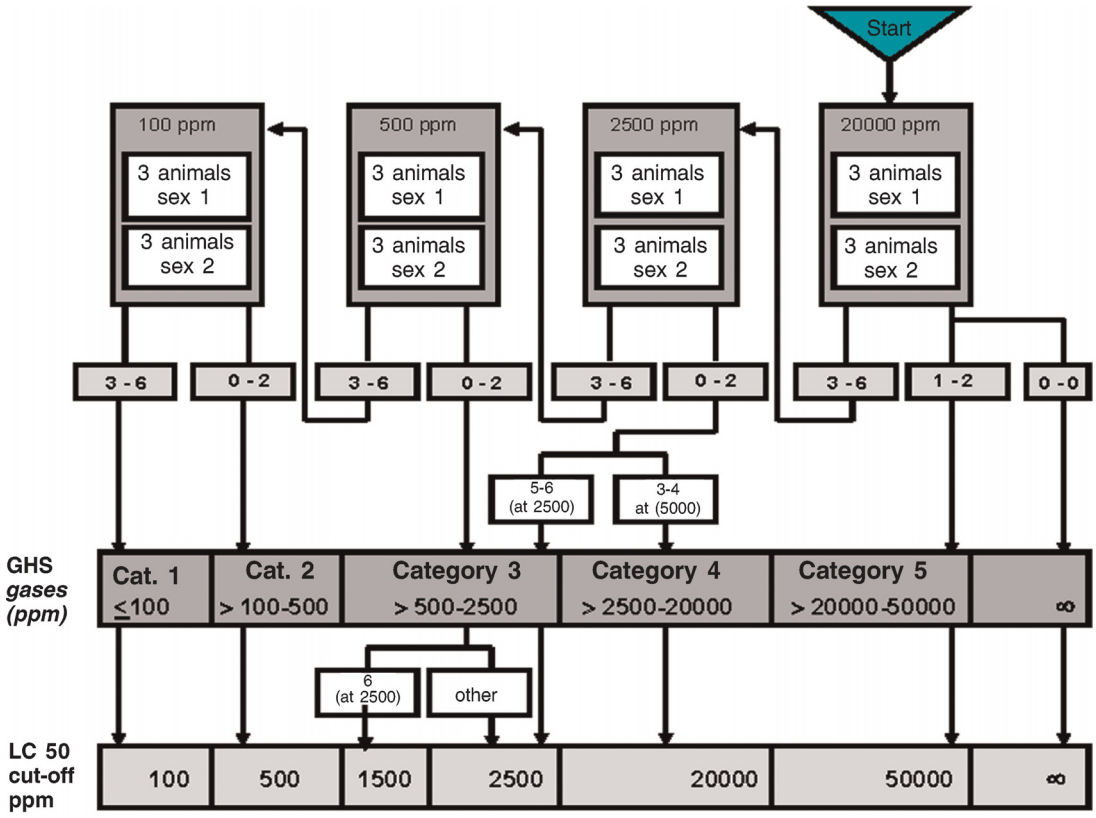
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 2 d

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 20 000 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 3

Höyryt: jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä noudatettava menettely (mg/l/4h)

Yleisiä huomioita ([1])

Jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä on noudatettava tässä lisäyksessä olevan testimallin mukaista menettelyä.

Lisäys 3 a: Aloituspitoisuus on 0,5 mg/l.

Lisäys 3 b: Aloituspitoisuus on 2,0 mg/l.

Lisäys 3 c: Aloituspitoisuus on 10 mg/l.

Lisäys 3 d: Aloituspitoisuus on 20 mg/l.

Testimenetelmässä edetään merkittyjen nuolten mukaisesti sen mukaan, kuinka monta eläintä on lopetettu humaaneista syistä tai kuinka monta eläintä on kuollut.

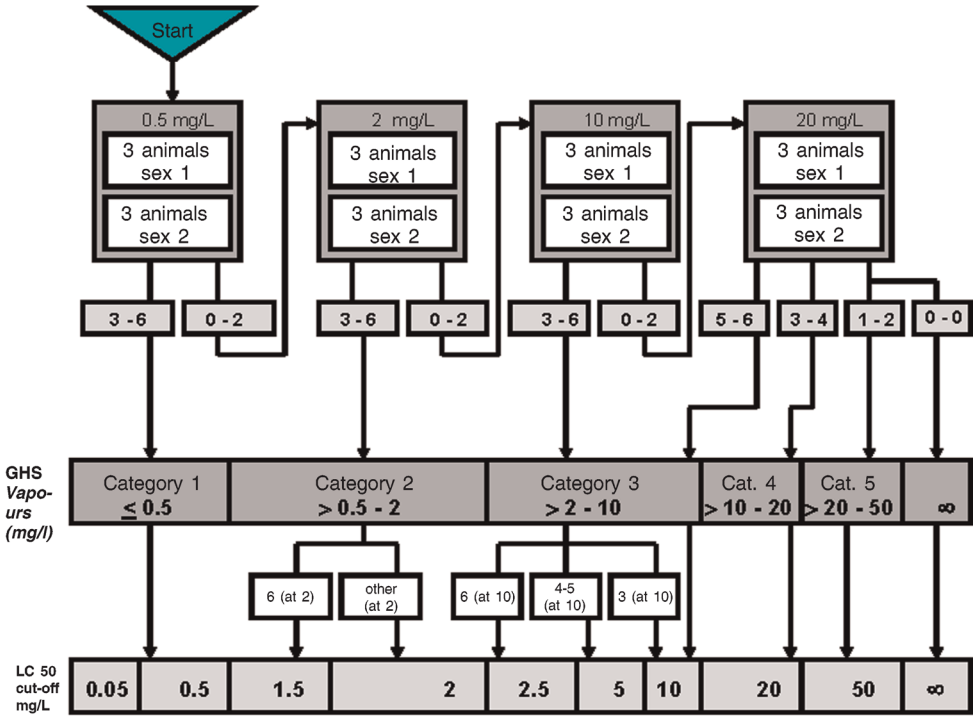
([1]) Seuraavissa taulukoissa tarkoitetaan yhdenmukaistettua kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmää (GHS). EU:ssa sitä vastaa asetus (EY) N:o 1272/2008. Akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä tutkittaessa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 ei käytetä luokkaa 5.

▼M4

Lisäys 3 a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for vapours



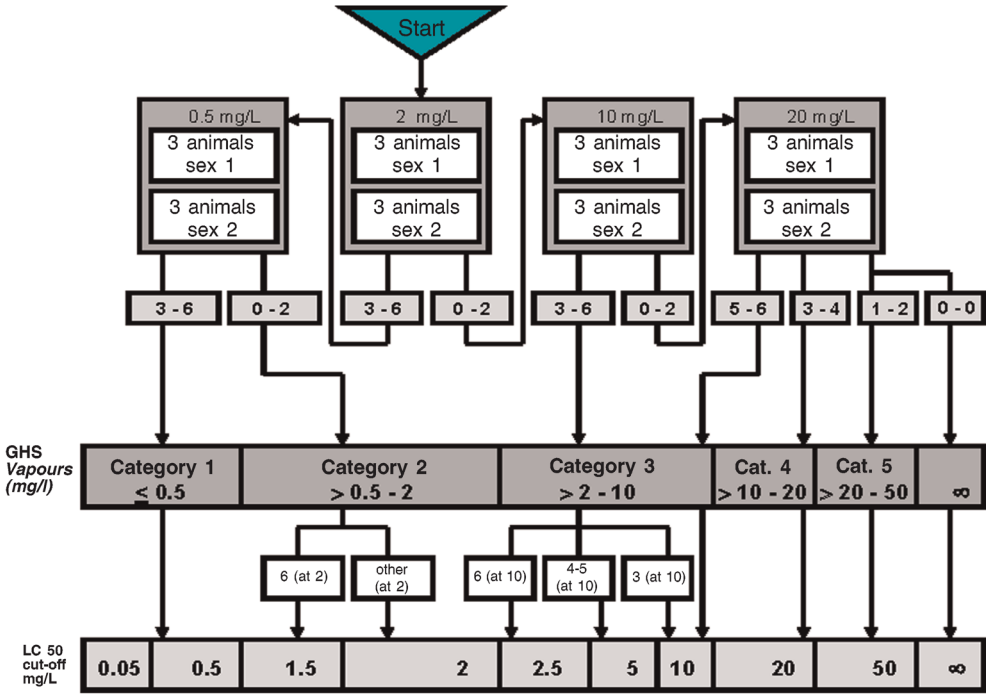
- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 3 b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 2 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

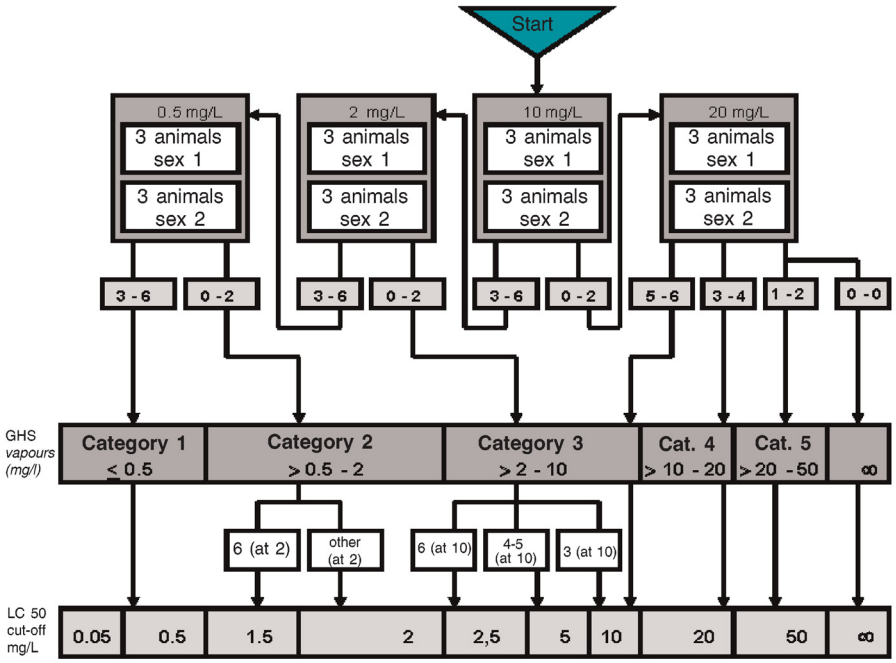
— Testing at 50 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 3 c

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours



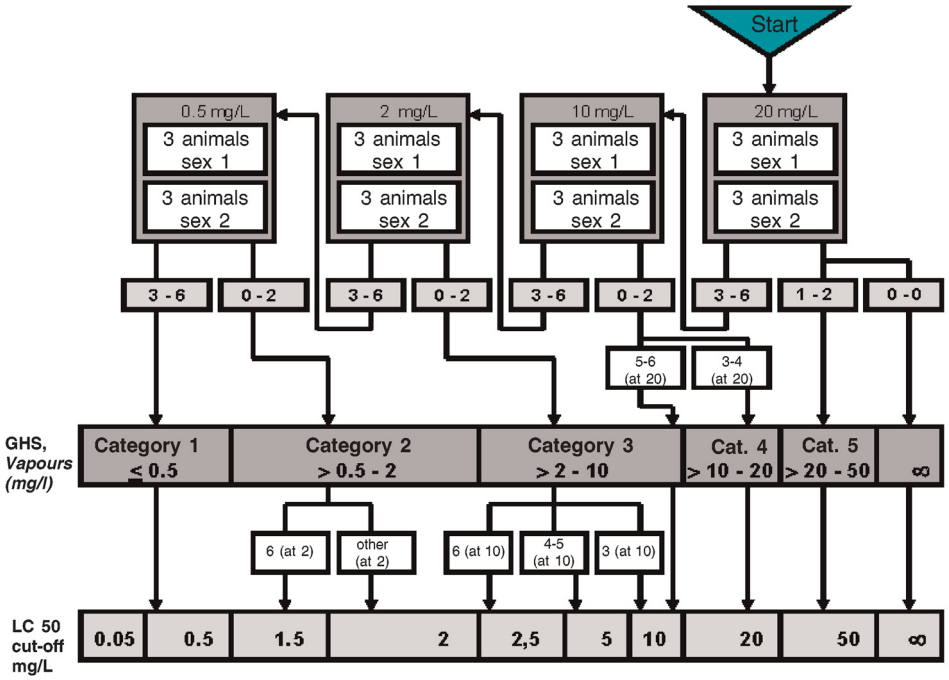
- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used pers step
- 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 3 d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39(8)

▼M4

Lisäys 4

Aerosolit: jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä noudatettava menettely (mg/l/4h)

Yleisiä huomioita ([1])

Jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä on noudatettava tässä lisäyksessä olevan testimallin mukaista menettelyä.

Lisäys 4 a: Aloituspitoisuus on 0,05 mg/l.

Lisäys 4 b: Aloituspitoisuus on 0,5 mg/l.

Lisäys 4 c: Aloituspitoisuus on 1 mg/l.

Lisäys 4 d: Aloituspitoisuus on 5 mg/l.

Testimenetelmässä edetään merkittyjen nuolten mukaisesti sen mukaan, kuinka monta eläintä on lopetettu humaaneista syistä tai kuinka monta eläintä on kuollut.

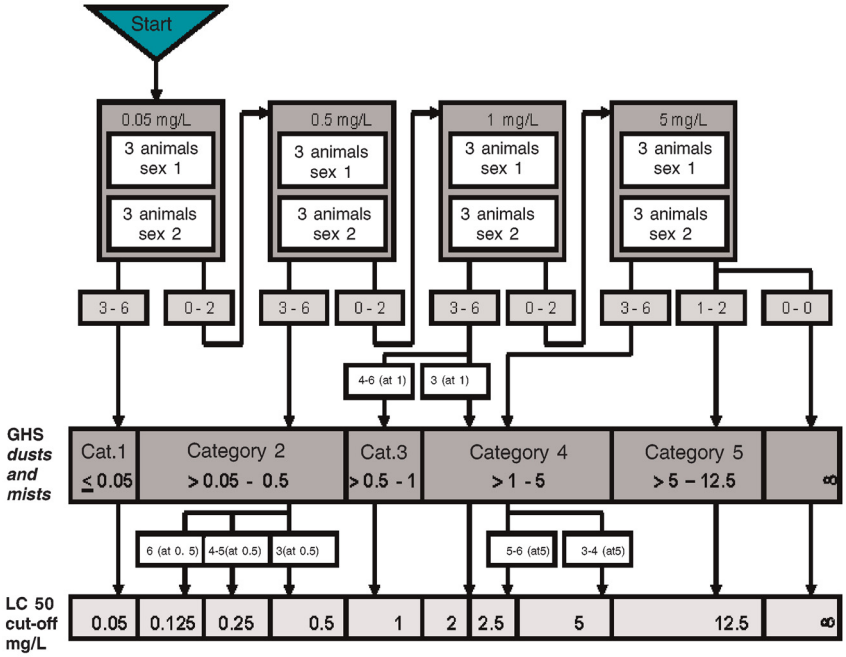
([1]) Seuraavissa taulukoissa tarkoitetaan yhdenmukaistettua kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmää (GHS). EU:ssa sitä vastaa asetus (EY) N:o 1272/2008. Akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä tutkittaessa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 ei käytetä luokkaa 5.

▼M4

Lisäys 4 a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,05 mg/L/4h for aerosols



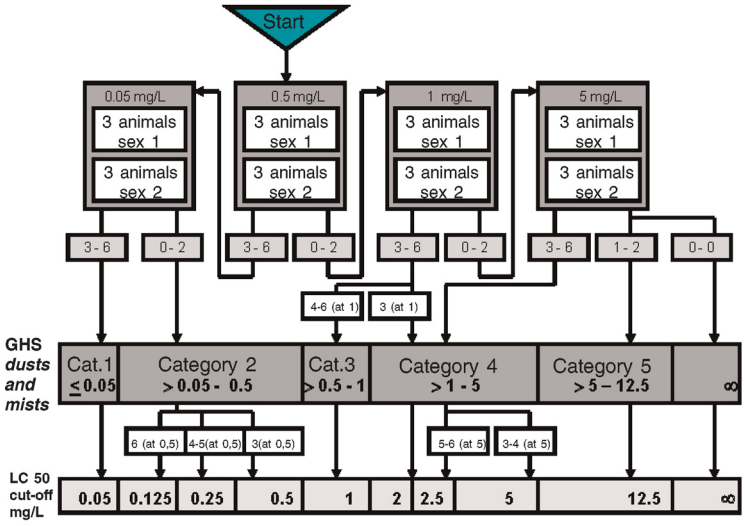
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 4 b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,5 mg/L/4h for aerosols



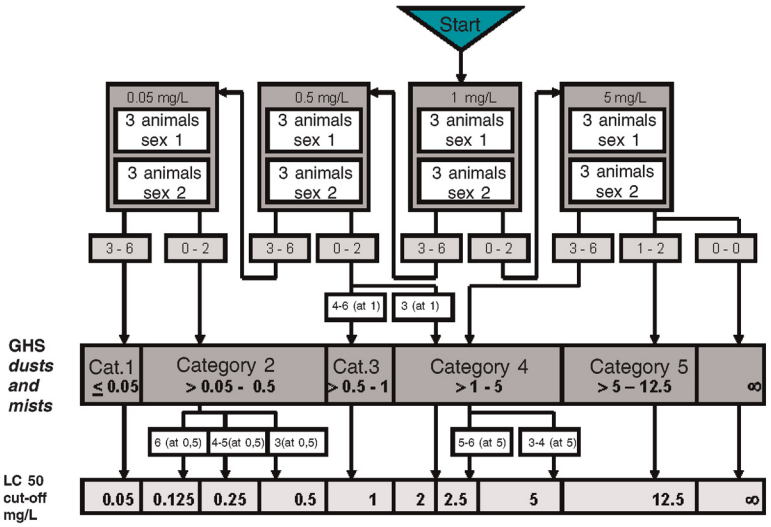
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 4 c

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols



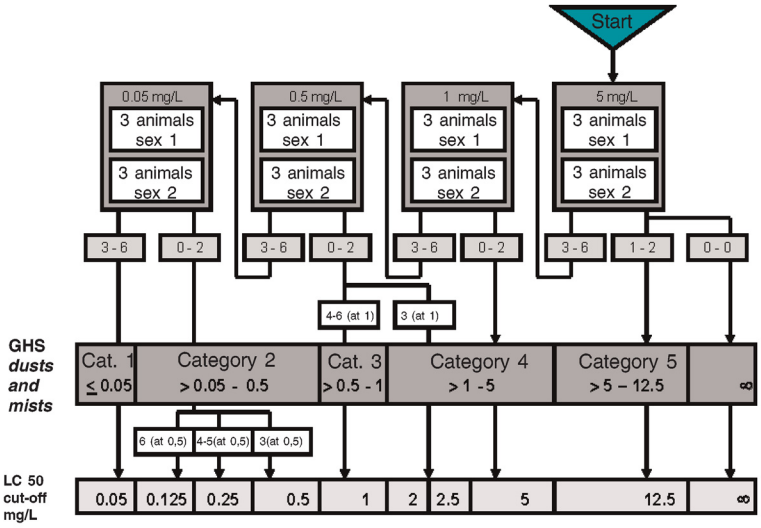
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 4 d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 5 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6 : Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)”

▼B

OSA C: EKOMYRKYLLISYYDEN MÄÄRITTÄMISMENETELMÄT

SISÄLLYSLUETTELO

C.1. AKUUTTI MYRKYLLISYYS KALALLE

C.2. AKUUTIN IMMOBILISAATION TESTI

C.3. MAKEAN VEDEN LEVIEN JA SYANOBAKTEERIEN KASVUNESTYMISTESTI

C.4. BIOHAJOAVUUDEN MÄÄRITYS

OSA I. YLEISTÄ

OSA II. DOC DIE-AWAY-KOE (Menetelmä C.4-A)

OSA III. MUUNNELTU OECD-SEULONTAKOE (Menetelmä C.4-B)

OSA IV. HIILIDIOKSIDIN MUODOSTUMISKOE (Menetelmä C.4-C)

OSA V. MANOMETRINEN RESPIROMETRIAKOE (Menetelmä C.4-D)

OSA VI. SULJETUN PULLON MENETELMÄ (Menetelmä C.4-E)

OSA VII. MITI-KOE (Menetelmä C.4-F)

C.5. HAJOAMINEN — BIOKEMIALLINEN HAPENKULUTUS

C.6. HAJOAMINEN — KEMIALLINEN HAPENKULUTUS

C.7. HAJOAMINEN — ABIOOTTINEN HAJOAMINEN: HYDROLYYSI PH:NFUNKTIONA

C.8. MYRKYLLISYYSTUTKIMUS MADOILLA

C.9. BIOLOGINEN HAJOAMINEN — ZAHN-WELLENS-TESTI

C.10. SIMULAATIOTUTKIMUS: AEROBINEN VIEMÄRILIETTEEN KÄSITTELY: C.10-A: AKTIIVILIETEYKSIKÖT – C.10-B: BIOKALVOT

C.11. BIOLOGINEN HAJOAMINEN — AKTIIVILIETTEEN SOLUHENGITYKSEN INHIBITIOTESTI

C.12. BIOLOGINEN HAJOAMINEN — MODIFIOITU SCAS-TESTI

C.13. BIOKERTYVYYS: TESTI KALOILLA LÄPIVIRTAUSOLOSUHTEISSA

C.14. KALANPOIKASILLA TEHTÄVÄ KASVUTESTI

C.15. KALAN ALKIO- JA RUSKUAISPUSSIVAIHEEN POIKASILLA TEHTÄVÄ LYHYTAIKAINEN MYRKYLLISYYSTESTI

C.16. MEHILÄISET — SUUN KAUTTA TAPAHTUNEEN ALTISTUKSEN JÄLKEEN ILMENEVÄN VÄLITTÖMÄN MYRKYLLISYYDEN TESTI

C.17. MEHILÄISET — KOSKETUS ALTISTUKSEN JÄLKEEN ILMENEVÄN VÄLITTÖMÄN MYRKYLLISYYDEN TESTI

C.18. ADSORPTIO/DESORPTIO ERÄTASAPAINOMENETELMÄÄ KÄYTTÄEN

▼**B**

C.19. MAA-AINEKSIIN JA VIEMÄRILIETTEESEEN SOVELLETTAVAN ADSORPTIOKERTOIMEN *(K_{OC})* MÄÄRITYS KORKEAN SUORITUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIALLA (HPLC)

C.20. LISÄÄNTYMISTESTI VESIKIRPULLA *(DAPHNIA MAGNA)*

C.21. MAAPERÄN MIKROBIT: TYPEN MUUNTUMISTESTI

C.22. MAAPERÄN MIKROBIT: HIILEN MUUNTUMISTESTI

C.23. KEMIKAALIEN AEROBINEN JA ANAEROBINEN HAJOAMINEN MAAPERÄSSÄ

C.24. AEROBINEN JA ANAEROBINEN HAJOAMINEN VESIYMPÄRISTÖN SEDIMENTTIJÄRJESTELMISSÄ

C.25. AEROBINEN MINERALISAATIO PINTAVEDESSÄ – BIOHAJOAVUUDEN SIMULAATIOTESTI

C.26. LIMASKOJEN (*LEMNA* SP.) KASVUNESTYMISTESTI

▼**M4**

C.27. MYRKYLLISYYSTESTI CHIRONOMID-ELIÖLLÄ VESI-SEDIMENTTISYSTEEMISSÄ KÄYTTÄEN SEDIMENTTIÄ, JOHON TUTKITTAVAA AINETTA ON LISÄTTY

C.28. MYRKYLLISYYSTESTI CHIRONOMID-ELIÖLLÄ VESI-SEDIMENTTISYSTEEMISSÄ KÄYTTÄEN VETTÄ, JOHON TUTKITTAVAA AINETTA ON LISÄTTY

C.29. BIOHAJOAVUUS – CO_2 SULJETUISSA ASTIOISSA (HEADSPACE-TESTI)

C.30. BIOKERTYVYYS MAALLA ELÄVISSÄ HARVASUKASMADOISSA

▼B

C.1 AKUUTTI MYRKYLLISYYS KALALLE

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä voidaan määrittää aineen akuutti tappava myrkyllisyys kalalle makeassa vedessä. Sopivimman testimenetelmän (staattinen, puolistaattinen tai läpivirtaus) löytämiseksi on suositeltavaa hankkia mahdollisuuksien mukaan tietoa aineen vesiliukoisuudesta, höyrynpaineesta, kemiallisesta stabiiliudesta, dissosiaatiovakiosta ja biohajoavuudesta. Näin voidaan varmistaa, että aineen pitoisuus pysyy lähes vakiona koejakson aikana.

Kokeen suunnittelussa ja tulosten tulkinnassa on otettava huomioon mahdolliset lisätiedot (esimerkiksi aineen rakennekaava, puhtausaste, merkittävien epäpuhtauksien laatu ja pitoisuus, lisäaineiden läsnäolo ja määrä sekä n-oktanoli/vesi-jakautumiskerroin).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Akuutti myrkyllisyys on selvästi havaittava haitta, joka aiheutuu eliölle lyhyen ajan kuluessa aineelle altistumisen jälkeen. Kuvattavassa kokeessa akuutti myrkyllisyys ilmaistaan tappavan pitoisuuden mediaanina (LC_{50}). Tappavaa pitoisuutta käytettäessä 50 % vedessä olevasta kalaerästä kuolee määritetyn altistusajan kuluessa.

Testattavan aineen kaikki pitoisuudet ilmaistaan painoyksikköinä tilavuutta kohti (mg/l). Pitoisuus voidaan ilmaista myös painoyksikköinä painoa kohti (mg/kg^{-1}).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuainetta testaamalla voidaan osoittaa, että laboratorio-olosuhteissa testattavien lajien vaste ei ole merkittävästi muuttunut.

Kuvattavaa koetta varten ei ole määritetty vertailuainetta.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Rajatestin (100 mg/l) avulla voidaan osoittaa, että LC_{50}-arvo on suurempi kuin rajatestipitoisuus.

Kaloja altistetaan veteen lisätylle aineelle eri pitoisuuksia käyttäen 96 tunnin ajan. Kuolleisuus kirjataan vähintään 24 tunnin väliajoin ja mahdollisuuksien mukaan lasketaan kunkin havaintohetken pitoisuus, joka on tappanut 50 % kaloista (LC_{50}).

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä on sovellettava sekä rajatestiin että kattavaan testiin.

Kontrolliryhmien kuolleisuus kokeen päätyttyä ei saa ylittää 10:tä % (tai yhtä kalaa, jos ryhmän koko on alle kymmenen kalaa).

Veteen liuenneen hapen pitoisuuden on ollut oltava yli 60 % testilämpötilan ilmakyllästymisarvosta.

▼B

Testattavan aineen pitoisuuden on koko testin ajan oltava vähintään 80 % alkupitoisuudesta.

Jos aine liukenee helposti veteen muodostaen stabiilin liuoksen (aine ei merkittävästi haihdu, pilkkoudu, hydrolysoidu tai adsorboidu), alkupitoisuutta voidaan pitää nimellisenä pitoisuutena. On esitettävä todisteet siitä, että pitoisuudet on pidetty vakiona testin ajan ja että laatukriteerit on täytetty.

Jos aine

i) on huonosti veteen liukenevaa,

ii) pystyy muodostamaan stabiileja emulsioita tai dispersioita,

iii) ei ole stabiilia vesiliuoksissa,

alkupitoisuutena pidetään liuoksesta mitattua pitoisuutta (jos tämä ei ole teknisesti mahdollista, pitoisuus mitataan vesipatsaasta) testin alussa. Pitoisuus määritetään tasapainon saavuttamisen jälkeen, mutta ennen testattavien kalojen lisäämistä.

Tällaisissa tapauksissa testin kuluessa on tehtävä lisämittauksia, joilla voidaan varmistaa todelliset altistuspitoisuudet ja laatukriteerien täyttyminen.

pH-arvo saa vaihdella enintään yhden yksikön verran.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

Käytettävissä on kolme erityyppistä menetelmää:

Staattinen koe

Tässä myrkyllisyyskokeessa vesiliuos ei virtaa (liuokset pysyvät muuttumattomina testin ajan).

Puolistaattinen koe

Tässä kokeessa vesiliuos ei virtaa, mutta se vaihdetaan säännöllisesti (esimerkiksi 24 tunnin väliajoin) eräkohtaisesti.

Läpivirtauskoe

Myrkyllisyyskoe, jossa testikammioiden vesi vaihtuu jatkuvasti. Testattava kemikaali kulkeutuu veden mukana.

1.6.1 **Reagenssit**

1.6.1.1 *Testattavien aineiden liuokset*

Valmistetaan halutun pitoisia kantaliuoksia liuottamalla ainetta ionisoimattomaan veteen tai kohdan 1.6.1.2 mukaiseen veteen.

Halutut testipitoisuudet valmistetaan kantaliuosta laimentamalla. jos testataan suuria pitoisuuksia, aine voidaan liuottaa suoraan laimennusveteen.

▼B

Yleensä aineita ei pidä testata liukoisuusrajan ylittävinä pitoisuuksina. Joidenkin aineiden kohdalla — esimerkiksi sellaisten, jotka liukenevat huonosti veteen (suuri P_{ow}-arvo) ja sellaisten, jotka muodostavat dispersioita todellisen liuoksen sijasta — on hyväksyttävää käyttää liukoisuusrajan ylittävää testipitoisuutta, jotta voidaan varmistaa, että ainetta on liuennut mahdollisimman paljon ja että liuos on stabiili. On kuitenkin tärkeää, että tämä pitoisuus ei muutoin häiritse testijärjestelmää (esimerkiksi muodostamalla veden pinnalle kalvon, joka estää veden hapettumisen).

Jos aine liukenee huonosti veteen, kantaliuoksen valmistamisessa tai aineen dispergoimisessa testiliuokseen voidaan käyttää apuna ultraäänidispersiota, orgaanisia liuottimia, emulsioliuottimia tai dispergoimisaineita. Jos tällaisia apuaineita käytetään, kaikkien testipitoisuuksien on sisällettävä sama määrä apuainetta ja erillinen kalojen kontrolliryhmä on altistettava testisarjan apuainepitoisuudelle. Tällaisten apuaineiden pitoisuudet on pidettävä mahdollisimman matalina, eivätkä ne koskaan saa ylittää arvoa 100 mg/l testiliuosta.

Koe suoritetaan ilman pH-arvon säätöjä. Jos havaitaan merkkejä pH-arvon merkittävästä muutoksesta, on suositeltavaa tehdä toinen koe, jossa käytetään pH-säätöä, ja raportoida tulokset. Tässä tapauksessa kantaliuoksen pH-arvo säädetään samaksi kuin laimennusveden pH-arvo, ellei tätä vastaan ole erityistä syytä. Suositeltavat pH-säätöaineet ovat HCl ja NaOH; pH-säätö on tehtävä siten, ettei kantaliuoksen testiainepitoisuus muutu merkittävästi. Jos pH-säädön seurauksena tapahtuu jokin kemiallinen reaktio tai testiaine saostuu, ilmiö on raportoitava.

1.6.1.2 *Säilytys- ja laimennusvesi*

Voidaan käyttää juomavettä (jossa ei ole potentiaalisesti vaarallisia pitoisuuksia klooria, raskasmetalleja tai muita aineita), hyvänlaatuista luonnonvettä tai sekoitevettä (katso liitettä I). Suositeltavat kovuusarvot ovat 10–250 mg/l $CaCO_3$ ja suositeltavat pH-arvot 6,0–8,5.

1.6.2 **Laite**

Laitteiden on oltava kemiallisesti inerttiä materiaalia. Seuraavat laitteet tarvitaan:

— automaattinen laimennusjärjestelmä (läpivirtauskoetta varten),

— happimittari,

— laite veden kovuuden määritykseen,

— lämpötilan säätölaite,

— pH-mittari.

1.6.3 **Testattavat kalat**

Kalojen on oltava terveitä, eikä niissä saa olla näkyviä epämuodostumia.

▼B

Lajit valitaan käytännöllisten seikkojen perusteella. Tällaisia perusteita ovat esimerkiksi ympärivuotinen saatavuus, ylläpidon helppous, soveltuvuus testaukseen, suhteellinen kemikaaliherkkyys ja muut taloudelliset, biologiset sekä ekologiset tekijät, joilla voi olla vaikutusta. Kalalajien valinnassa on otettava huomioon myös saatujen tietojen vertailukelpoisuus ja voimassa oleva kansainvälinen yhdenmukaistaminen (viite 1).

Luettelo tätä koetta varten suositeltavista kalalajeista on liitteessä 2. Suositeltavia lajeja ovat seeprakala ja kirjolohi.

1.6.3.1 *Säilytys*

Kalat on mieluiten otettava yhdestä ainoasta samanpituisesta ja -ikäisestä kannasta. Kaloja on säilytettävä vähintään 12 päivän ajan seuraavissa olosuhteissa:

Täyttötapa

Täyttötavan on oltava sopiva järjestelmää ja kalalajia ajatellen.

Vesi

Katso kohtaa 1.6.1.2.

Valo

Päivittäisen valojakson pituus on 12–16 tuntia.

Liuenneen hapen pitoisuus

Vähintään 80 % kyllästysarvosta.

Ruokinta

Kaloja ruokitaan kolme kertaa viikossa tai päivittäin. Ruokinta lopetetaan 24 tuntia ennen kokeen alkua.

1.6.3.2 *Kuolleisuus*

48 tunnin asettumisajan jälkeen kuolleisuus kirjataan seuraavia kriteerejä soveltaen:

— yli 10 % populaatiosta seitsemässä päivässä:

koko erä hylätään

— 5–10 % populaatiosta:

tarkkailujaksoa jatketaan seitsemällä päivällä. Ellei lisäkuolleisuutta esiinny, erä hyväksytään

— alle 5 % populaatiosta:

erä hyväksytään.

1.6.4 **Sopeutuminen**

Kaloja on altistettava kokeessa käytettävälle vedelle ja lämpötilalle vähintään seitsemän päivän ajan ennen kalojen käyttöä.

▼B

1.6.5 **Testin suorittaminen**

Ennen varsinaista testiä voidaan tehdä alueenmäärityskoe, jonka avulla saadaan tietoja varsinaisessa testissä käytettävistä pitoisuuksista.

Testiryhmän lisäksi käytetään kontrolliryhmää, jota ei altisteta aineelle. Jos aineen liuottamiseen on käytetty apuainetta, on käytettävä toista kontrolliryhmää, joka altistetaan apuaineelle.

Valitaan staattinen, puolistaattinen tai läpivirtaukseen perustuva menetelmä testattavan aineen fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien mukaan.

Kalat altistetaan aineelle seuraavasti:

— aika: 96 tuntia,

— eläinten määrä: vähintään 7 kalaa pitoisuutta kohti,

— säiliöt: tilavuus on mukautettava kuormitussuosituksen mukaan,

— kuormitus: staattista ja puolistaattista koetta varten kuormituksen enimmäisarvoksi suositellaan 1 g/l (läpivirtausjärjestelmissä kuormitus voi olla suurempi),

— aineen pitoisuus: vähintään viisi pitoisuutta, jotka poikkeavat toisistaan kertoimella, jonka enimmäisarvo on 2,2, ja jotka kattavat kuolleisuusalueen 0–100 % mahdollisimman hyvin,

— vesi: katso kohtaa 1.6.1.2,

— valo: 12–16 tuntia valoa päivittäin,

— lämpötila: lajille sopiva lämpötila (katso liitettä 2), joka saa vaihdella yksittäisen kokeen aikana enintään ± 1 °C,

— veteen liuennut happi: vähintään 60 % valitun lämpötilan ilmakyllästymisarvosta,

— ruokinta: kaloja ei ruokita.

Kalat tutkitaan ensimmäisten 2–4 tunnin aikana ja vähintään 24 tunnin väliajoin. Kalat katsotaan kuolleiksi, jos pyrstön koskettaminen ei tuota mitään reaktiota eikä hengitysliikkeitä voi havaita. Kuolleet kalat poistetaan ja kuolleisuudet kirjataan. Näkyvistä poikkeavuuksista pidetään kirjaa. Näitä ovat esimerkiksi tasapainon menettäminen ja muutokset uintitavassa, hengitystoiminnoissa sekä pigmentaatiossa.

Liuoksen pH, liuennut happi ja lämpötila mitataan päivittäin.

Rajatesti

Tämän testimenetelmän avulla voidaan suorittaa rajatesti pitoisuudella 100 mg/l, millä osoitetaan, että LC_{50}-arvo on suurempi kuin rajapitoisuus.

Jos aineesta ei saada vesiliuosta, jonka pitoisuus on 100 mg/l, rajatesti tehdään pitoisuudella, joka vastaa aineen liukoisuutta (tai enimmäispitoisuutta, jolla saadaan stabiili dispersio) käytettävään veteen (katso myös kohtaa 1.6.1.1).

▼B

Rajatestiin tarvitaan 7–10 kalaa ja samankokoinen kontrolliryhmä (yksi tai kaksi kontrolliryhmää). (Binomiteorian mukaan LC_{50}-arvo on 99,9 prosentin varmuudella suurempi kuin rajatestissä käytetty pitoisuus, jos yhtään kalaa kymmenestä ei kuole. Jos käytetään 7, 8 tai 9 kalaa, nollakuolleisuus osoittaa vähintään 99 prosentin varmuudella, että LC_{50}-arvo on suurempi kuin käytetty pitoisuus.)

Jos kaloja kuolee, on tehtävä kattava testi. Jos havaitaan vaikutuksia, jotka eivät ole hengenvaarallisia, ne on kirjattava.

2. **TIEDOT JA ARVIOINTI**

Jokaista havaintohetkeä (24:ää, 48:aa, 72:ta ja 96:ta tuntia) kohden piirretään jokaisen suositellun altistusjakson kuolleisuusprosentti pitoisuuden funktiona logaritmitodennäköisyyspaperille.

LC_{50}-arvo ja luottamusvälit ($p = 0,05$) arvioidaan havaintohetkittäin mahdollisuuksien mukaan yleisiä menetelmiä käyttäen. Arvot pyöristetään yhteen tai enintään kahteen merkitsevään numeroon (esimerkki pyöristyksestä kahteen merkitsevään numeroon: 173,5 > 170; 0,127 > 0,13; 1,21 > 1,2).

Jos pitoisuus/vaste (%) -käyrä on liian jyrkkä LC_{50}-arvon laskemiseksi, arvon graafinen arvio on riittävän tarkka.

Jos kaksi peräkkäistä pitoisuutta (käyttäen kerrointa 2,2) antavat tulokseksi vain 0 %:n ja 100 %:n kuolleisuuden, nämä kaksi arvoa riittävät osoittamaan alueen, johon LC_{50} osuu.

Jos todetaan, että testattavan aineen stabiiliutta tai homogeenisuutta ei voida ylläpitää, tämä on raportoitava ja otettava huomioon tulosten tulkinnassa.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— kalan tiedot kunkin pitoisuuden osalta (tieteellinen nimi, kanta, toimittaja, mahdolliset esikäsittelyt, koko ja määrä),

— laimennusveden lähde ja tärkeimmät kemialliset ominaisuudet (pH, kovuus, lämpötila),

— kantaliuoksen ja testiliuoksen valmistustapa, jos aine on huonosti veteen liukenevaa,

— mahdollisten apuaineiden pitoisuudet,

— luettelo käytetyistä pitoisuuksista ja käytettävissä olevat tiedot testattavan kemikaalin näiden pitoisuuksien stabiiliudesta käytetyssä testiliuoksessa,

— käytetyt menetelmät ja saadut tulokset, jos on tehty kemiallisia analyysejä,

— mahdollisen rajatestin tulokset,

— käytetyn menetelmän valintaperusteet ja yksityiskohtaiset tiedot (staattinen, puolistaattinen, annostelunopeus, läpivirtausnopeus, onko käytetty ilmastusta, kalakuormitus jne.),

▼B

— laitteen kuvaus,

— valo-olosuhteet,

— testiliukscn liuenneen hapen pitoisuus, pH-arvo ja lämpötila 24 tunnin väliajoin,

— todisteet laatukriteereiden täyttämisestä,

— taulukko, josta ilmenee kumulatiivinen kuolleisuus kussakin pitoisuudessa ja kontrolliryhmän (sekä tarvittaessa apuaineen kontrolliryhmän) tulokset kunakin suositeltuna tarkkailuajankohtana,

— pitoisuus/vaste (%) -käyrä kokeen päätyttyä,

— mahdollisuuksien mukaan LC_{50}-arvot kunakin suositeltuna tarkkailuajankohtana (95 prosentin luottamusrajoin),

— LC_{50}-arvon määrityksessä käytetyt tilastolliset menetelmät,

— mahdollisen vertailuainetta avulla saadut tulokset,

— suurin testiliuoksen pitoisuus, joka ei ole aiheuttanut kuolleisuutta kokeen aikana,

— pienin testiliuoksen pitoisuus, joka on aiheuttanut 100 prosentin kuolleisuuden kokeen aikana.

4. **VIITTEET**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,*11* and /3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae)*. Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L(15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCK, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. and Exp. Therap., 1949, vol 96, 99.

(16) Finney, D. J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U. K, 1978.

(17) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793–821.

(18) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3–32.

(19) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hasard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, 65–84.

(20) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Lisäys 1

Sekoitevesi

Esimerkki sopivasta laimennusvedestä

Kaikkien kemikaalien on oltava analyyttistä laatua.

Veden on oltava hyvänlaatuista tislattua tai ionisoimatonta vettä, jonka johtavuus on alle 5 $\mu S/cm^{-1}$.

Veden tislauslaite ei saa sisältää kuparista valmistettuja osia.

Kantaliuokset

$CaCl_2$ x 2 H_2O (kalsiumkloridihydraatti):	11,76 g
Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen	
$MgSO_4$ x 7 H_2O (magnesiumsulfaattiheptahydraatti):	4,93 g
Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen	
$NaHCO_3$ (natriumvetykarbonaatti):	2,59 g
Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen	
KO (kaliumkloridi):	0,23 g
Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen	

Sekoitettu laimennusvesi

25 ml kutakin kantaseosta sekoitetaan ja liuos laimennetaan litran tilavuuteen.

Liuosta ilmastetaan, kunnes liuenneen hapen pitoisuus saavuttaa ilmakyllästymisarvon.

pH-arvon on oltava 7,8 ± 0,2.

pH:ta säädetään tarvittaessa NaOH:lla (natriumhydroksidilla) tai HCl:llä (suolahapolla).

Näin valmistettu sekoitevesi pannaan syrjään noin 12 tunniksi, eikä sitä tarvitse enää ilmastaa.

Liuoksen Ca- ja Mg-ionien yhteenlaskettu pitoisuus on 2,5 millimoolia/1. Ca- ja Mg-ionien suhde on 4:1 ja Na- ja K-ionien suhde 10:1. Liuoksen kokonaisalkalisuus on 0,8 millimoolia/1.

Mahdolliset poikkeavuudet laimennusveden valmistuksessa eivät saa vaikuttaa veden koostumukseen tai sen ominaisuuksiin.

▼B

Liite 2

Suositeltavat kalalajit

Suositeltava laji	Suositeltava testilämpötila-alue (°C)	Koe-eläimen suositeltava kokonaispituus (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) seeprakala	20–24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20–24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) karppi	20–24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck et Schlegel 1850) Red killifish	20–24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) miljoonakala	20–24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus(Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Bluegill	20–24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) kirjolohi	12–17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) säyne	20–24	6,0 ± 2,0

Saatavuus

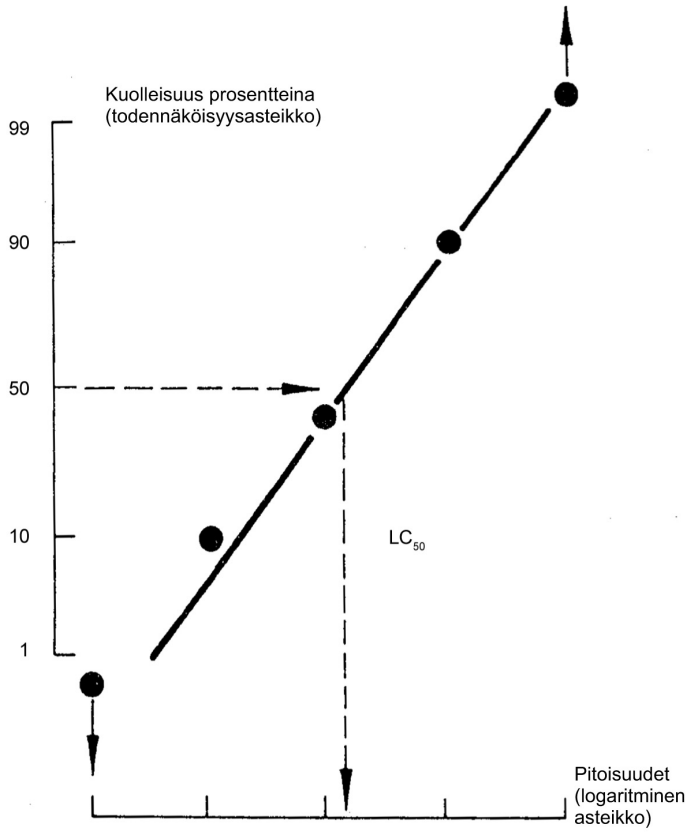
Edellä luetellut kalalajit ovat helposti viljeltävissä tai yleisesti saatavissa läpi koko vuoden. Niitä voidaan viljellä kalanviljelylaitoksissa tai laboratorioissa, edellyttäen, että sairauden ja loisten esiintymistä valvotaan. Näin saadaan terveitä koe-eläimiä, joiden tausta on tiedossa. Näitä kalalajeja on saatavana suuressa osassa maailmaa.

▼B

Liite 3

Pitoisuusesimerkki: prosentuaalinen kuolleisuus

Esimerkki LC_{50}-määrityksestä logaritmitodennäköisyyspaperin avulla



▼B

C.2. *DAPHNIA* SP. AKUUTIN IMMOBILISAATION TESTI

1. MENETELMÄ

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta TG 2002 (2004).

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä testataan akuuttia myrkyllisyyttä arvioimalla kemikaalien vaikutuksia vesikirppuihin *(Daphnia)*. Jo olemassa olevia testimenetelmiä käytetään hyväksi mahdollisuuksien mukaan (1) (2) (3).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

EC_{50}: pitoisuus, jossa 50 % vesikirpuista arvioidaan immobilisoituvan määrätyn altistusajan kuluessa. Jos käytetään muuta määritelmää, se on ilmoitettava viittauksineen.

Immobilisaatio: Eläimet, jotka eivät kykene uimaan 15 sekunnin kuluessa sen jälkeen, kun testiastiaa on heilutettu varovasti, katsotaan immobilisoituneiksi (vaikka ne voisivat edelleen liikuttaa tuntosarviaan).

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Nuoria vesikirppuja (testin alussa alle 24 tunnin ikäisiä) altistetaan testiaineelle sopivaksi arvioidulla pitoisuusalueella 48 tunnin ajan. Immobilisaatio kirjataan 24 ja 48 tunnin kuluttua ja sitä verrataan kontrolliarvoihin. Tulokset analysoidaan EC_{50}:n laskemiseksi 48 tunnin kohdalla (katso määritelmät kohdassa 1.2). EC_{50}:n määrittely 24 tunnin kohdalla on vapaaehtoista.

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Testiaineen vesiliukoisuus ja höyrynpaine on oltava tiedossa, ja aineen kvantifioimiseksi testiliuoksissa on oltava käytettävissä luotettava analyysimenetelmä, jonka saantoteho on raportoitu, ja määritysraja pitäisi olla saatavissa. Tarpeellisia tietoja ovat mm. rakennekaava, aineen puhtaus, stabiilisuus vedessä tai valossa, P_{ow} ja helpon biohajoavuuden testin (ks. testimenetelmä C.4) tulokset.

Huom.: Ohjeita sellaista tapausta varten, kun fysikokemialliset ominaisuudet tekevät testiaineista vaikeasti testattavia: kirjallisuusviite (4).

1.5 VERTAILUAINEET

Testiolosuhteiden luotettavuuden varmistamiseksi EC_{50} voidaan testata vertailuaineella. Tätä tarkoitusta varten suositellaan kansainvälisissä yhteistutkimuksissa (ring test) käytettyjä myrkyllisiä kemikaaleja (1) (5) ([1]). Suosituksena on, että vertailuaineella tehtävä koe tai kokeet suoritetaan joka kuukausi ja ainakin kahdesti vuodessa.

([1]) Näiden monilaboratoriotestien tulosten sekä oikaistun ISO 634 -standardin mukaan kaliumdikromaatin (K_2Cr_2O7) EC50 (24 h) sijoittuu välille 0,6 mg/l–1,7 mg/l.

▼B

1.6 LAATUVAATIMUKSET

Jotta testi olisi validi, seuraavien vaatimusten on täytyttävä:

— Kontrolleissa (mukaan lukien liuotusapuaineen sisältävä kontrolli) enintään 10 % vesikirpuista saa immobilisoitua.

— Liuenneen hapen pitoisuuden testin lopussa on oltava ≥ 3 mg/l kontrolli- ja koeastioissa.

Huom.: Ensimmäinen vaatimus merkitsee, että enintään 10 prosenttia kontrollivesikirpuista saa immobilisoitua tai osoittaa muita sairauden tai stressin merkkejä, esimerkiksi värimuutoksia tai epätavallista käyttäytymistä (esim. jääminen pysyvästi vedenpinnalle).

1.7 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.7.1 **Laitteet**

Astioiden ja muiden laitteiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Testiastiat ovat tavallisesti lasisia koeputkia tai dekanterilaseja. Ne on puhdistettava ennen jokaista käyttöä laboratorion normaaleilla menettelyillä. Koeastiat on peitettävä väljästi, jotta vältettäisiin veden menetys haihtumisen kautta ja pölyn pääsy liuoksiin. Haihtuvat aineet pitäisi testata täysin suljetuissa astioissa, jotka ovat tarpeeksi suuria, ettei happipitoisuus muodostu rajoittavaksi tekijäksi tai alene liiaksi (ks. kohta 1.6 ja kohdan 1.8.3 ensimmäinen alakohta).

Lisäksi tarvitaan joitakin tai kaikkia seuraavista laitteista: happimittari (joka on varustettu mikroelektrodilla tai muulla sopivalla laitteella, jolla voidaan mitata liuennut happi pienitilavuuksisissa näytteissä); pH-mittari; asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön; laitteet orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuuden (TOC) mittaamiseen; laitteet kemiallisen hapenkulutuksen (COD) mittaamiseen; laitteet veden kovuuden mittaamiseen jne.

1.7.2 **Testiorganismi**

Testissä suositellaan käytettäväksi *Daphnia magna* Straus -organismia. Muita sopivia vesikirppulajeja (e.g. *Daphnia pulex)* saa myös käyttää. Testin alussa eläinten on oltava alle 24 tunnin ikäisiä, ja ominaisuuksien vaihtelun vähentämiseksi suositellaan painokkaasti, että ne eivät ole ensimmäistä sikiösarjaa. Niiden olisi oltava peräisin terveestä varastokannasta (ts. niissä ei saa näkyä merkkejä stressistä, kuten korkeaa kuolleisuutta, koiraita ja lepomunia, viivästymistä ensimmäisten sikiöiden tuottamisessa, värihäiriöisiä eläimiä jne.). Kaikkien tietyssä testissä käytettävien organismien on oltava peräisin saman vesikirppukannan viljelystä. Varastokannan eläimiä on pidettävä samanlaisissa viljelyoloissa (valo, lämpötila, viljelyneste) kuin testissä käytettäviä. Jos testissä käytettävä viljelyneste eroaa vesikirpun viljelyssä normaalisti käytetystä viljelynesteestä, on hyvä noudattaa käytäntöä, että eläimet totutetaan viljelyoloihin ennen testiä. Viljelystä saatuja vesikirppuja on tätä varten pidettävä laimennusvedessä testilämpötilassa vähintään 48 tunnin ajan ennen testin alkua.

▼B

1.7.3 **Viljely- ja laimennusvesi**

Luonnonvesi (pinta- tai pohjavesi), synteettinen vesi tai talousvesi, josta on poistettu kloori, ovat hyväksyttäviä viljely- ja laimennusvesiä, jos vesikirput voivat elää siinä viljelyn, totuttamisen ja testauksen ajan osoittamatta stressaantumisen merkkejä. Mikä tahansa vesi, joka täyttää liitteessä 1 mainitut hyväksyttävän liuoksen kemialliset ominaisuudet, soveltuu käytettäväksi testissä. Veden laadun on oltava tasainen testin ajan. Synteettinen vesi voidaan valmistaa lisäämällä tietyt määrät reagensseja (tunnustettu analyyttinen laatu) deionisoituun tai tislattuun veteen. Kirjallisuusviitteissä (1) ja (6) ja liitteessä 2 annetaan esimerkkejä synteettisestä vedestä. On huomattava, että tunnettuja kelatoivia aineita sisältäviä viljelynesteitä, kuten M4- ja M7-viljelynesteitä (ks. liite 2), ei suositella metalleja sisältävien aineiden testaukseen. pH-arvon pitäisi olla 6–9. *Daphnia Magna* -organismia varten suositellaan kovuutta 140–250 mg/l ($CaCO_3$), mutta muita *Daphnia*-organismeja varten käy myös vähäisempi kovuus. Laimennusvettä voidaan ilmastaa ennen testin alkua, jotta liuenneen hapen pitoisuus saavuttaa kyllästymispisteen.

Jos käytetään luonnonvettä, laatuparametrit on tarkistettava vähintään kahdesti vuodessa tai aina kun on epäilystä siitä, että nämä ominaisuudet ovat voineet muuttua merkittävästi (ks. edellinen kohta ja liite 1). Lisäksi on määritettävä raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni). Käytettäessä vettä, josta on poistettu kloori, suositellaan päivittäistä kloorianalyysiä. Jos laimennusvesi on pinta- tai pohjavesilähteestä, johtokyky, orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) tai kemiallinen hapenkulutus (COD) on mitattava.

1.7.4 **Testiliuokset**

Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan yleensä laimentamalla varastoliuosta. Varastoliuokset olisi mieluiten tehtävä liuottamalla testiaine laimennusveteen. Liuottimien, emulgointiaineiden tai dispergointiaineiden käyttöä olisi mahdollisuuksien mukaan vältettävä. Niitä voidaan kuitenkin tarvita joissakin tapauksissa sopivan väkevyisen varastoliuoksen valmistamiseksi. Kirjallisuusviitteessä (4) on tietoa sopivien liuottimien, emulgointiaineiden tai dispergointiaineiden käytöstä. Testiaineen pitoisuus testiliuoksissa ei saa missään tapauksessa ylittää aineen liukoisuusrajaa laimennusvedessä.

Testi on suoritettava säätämättä pH:ta. Jos pH ei pysy välillä 6–9, voidaan suorittaa toinen testi, jossa varastoliuoksen pH säädetään vastaamaan laimennusveden pH:ta ennen testiaineen lisäämistä. pH:ta säädettäessä on huolehdittava siitä, että varastoliuoksen pitoisuus ei muutu merkittävässä määrin ja ettei aiheuteta kemiallisia reaktioita eikä saostumista testiaineessa. Suositeltavia aineita ovat HCl ja NaOH.

▼B

1.8 MENETTELY

1.8.1 **Altistusolosuhteet**

1.8.1.1 *Testi- ja kontrolliryhmät*

Koeastiat täytetään sopivaan tilavuuteen laimennusvedellä ja testiaineen sisältävillä liuoksilla. Ilman ja veden tilavuuden keskinäisen suhteen astiassa pitäisi olla sama sekä testi- että kontrolliryhmässä. Vesikirput pannaan astioihin. Kutakin testipitoisuutta ja kontrolliryhmää varten olisi käytettävä vähintään 20 eläintä, mielellään jaettuina neljään viiden eläimen ryhmään. Kutakin eläintä varten olisi varattava vähintään 2 ml testiliuosta (ts. 10 ml testiliuosta viittä vesikirppua ja yhtä koeastiaa kohti). Testi suoritetaan siten, että liuos vaihtuu semistaattisissa oloissa tai läpivirtausolosuhteissa, jos testiaineen pitoisuus ei ole stabiili.

Testisarjan lisäksi on suoritettava yksi laimennusvesikontrollisarja ja tarvittaessa myös yksi liuotusapuaineen sisältävä kontrollisarja.

1.8.1.2 *Testipitoisuudet*

Varsinaisen testin pitoisuusalueiden määrittämiseksi voidaan tehdä pitoisuusalueen määrittelykoe, jollei testiaineen myrkyllisyydestä ole saatavilla tietoa. Tätä varten vesikirput altistetaan useille testiaineen pitoisuuksille laajoin pitoisuusvälein. Viisi vesikirppua on altistettava kullekin pitoisuudella enintään 48 tunnin ajaksi. Rinnakkaiskokeita ei tarvita. Altistusaika voidaan lyhentää (esim. 24 tuntiin tai tämän alle), jos pitoisuusalueen määrittelyyn sopivat tiedot saadaan lyhyemmässä ajassa.

Kokeessa pitäisi olla vähintään viisi testipitoisuutta geometrisessa sarjassa, eikä kerroin saisi olla suurempi kuin 2,2. Jos käytetään vähempää määrää pitoisuuksia, tämä on perusteltava. Suosituksena on, että suurin testattava pitoisuus johtaa 100 prosentin immobilisaatioon ja että pienin testattava pitoisuus ei aiheuta havaittavaa vaikutusta.

1.8.1.3 *Inkubaatio-olosuhteet*

Lämpötilan pitäisi olla välillä 18–22 °C ja pysyä kussakin yksittäisessä testissä vakiona (± 1 °C). Testissä suositellaan käytettäväksi sykliä, jossa on 16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeyttä. Myös jatkuva pimeys hyväksytään, erityisesti jos testiaine on epästabiili valossa.

Koeastioita ei saa ilmastaa testin aikana. Testi suoritetaan säätämättä pH:ta. Vesikirppuja ei saa ruokkia testin aikana.

1.8.1.4 *Kesto*

Testin kesto on 48 tuntia.

1.8.2 **Huomautukset**

Kunkin koeastian osalta on tarkistettava 24 ja 48 tunnin kuluttua testin alusta, onko siinä immobilisoituneita vesikirppuja (ks. määritelmät kohdassa 1.2). Immobilisaation lisäksi on kirjattava mahdollinen epänormaali käyttäytyminen tai ulkonäkö.

▼B

1.8.3 **Mittaukset**

Liuennut happi ja pH määritetään testin alussa ja lopussa kontrollissa (tai kontrolleissa) ja testiaineen suurimmassa pitoisuudessa. Kontrolleissa todetun liuenneen hapen pitoisuuden olisi oltava laatuvaatimuksen mukainen (ks. kohta 1.6). pH-arvo ei tavallisesti saisi vaihdella enemmän kuin 1,5 yksikköä yksittäisessä testissä. Lämpötila mitataan yleensä kontrolliastioista tai ilmasta, ja sitä on rekisteröitävä mielellään jatkuvaluonteisesti testin aikana tai vähintään testin alussa ja lopussa.

Vähintään suurin ja pienin testiaineen pitoisuus olisi mitattava testin alussa ja lopussa (4). Tulokset on suositeltavaa määritellä mitattujen pitoisuuksien perusteella. Jos on näyttöä siitä, että testattavan aineen pitoisuus on pysynyt tyydyttävällä tavalla ± 20 prosentissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulokset voivat perustua nimellispitoisuuksiin tai alkupitoisuuksiin.

1.9 RAJA-ANNOSTESTI

Tässä testimenetelmässä kuvattuja menettelyjä käyttäen voidaan suorittaa raja-annostesti, jossa testiaineen pitoisuus on 100 mg/l tai sama kuin aineen liukoisuusraja-arvo testissä käytettävässä viljelynesteessä (sen mukaan, kumpi on alempi), sen osoittamiseksi, että EC_{50} on suurempi kuin kyseinen pitoisuus. Raja-annostesti on suoritettava 20 vesikirpulla (jotka suositellaan jaettaviksi neljään viiden eläimen ryhmään). Kontrollissa (tai kontrolleissa) niitä on oltava sama määrä. Jos immobilisaatiota havaitaan, on tehtävä täydellinen testi. Mahdollinen epänormaali käyttäytyminen on kirjattava.

2. **TULOKSET**

Tulokset on esitettävä taulukkomuodossa siten, että sekä testi- että kontrolliryhmistä ilmoitetaan käytetty vesikirppujen määrä ja immobilisaatio kunakin havaintoajankohtana. Prosentuaalinen immobilisaatio 24 ja 48 tunnin kohdalla on esitettävä graafisesti testipitoisuuksien funktiona. Tulokset analysoidaan sopivilla tilastomenetelmillä (esim. probittianalyysi), ja kuvaajien kulmakertoimet ja EC_{50} lasketaan 95 prosentin luottamusvälillä ($p = 0,05$) (7) (8).

Jos EC_{50}:n tavanomaiset laskentamenetelmät eivät sovellu saatuun aineistoon, sitä suurinta pitoisuutta, joka ei aiheuta immobilisaatiota, ja sitä pienintä pitoisuutta, joka aiheuttaa 100 prosentin immobilisaation, on käytettävä likiarvon laskemiseen siten, että EC_{50} katsotaan kyseisten kahden pitoisuuden geometriseksi keskiarvoksi.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä,

▼B

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan lukien puhtaus.

Koelajit:

— *Daphnian* laji ja hankintapaikka tai alkuperä (jos se tunnetaan) sekä käytetyt viljelyolosuhteet (mm. ravinnon lähde, tyyppi ja määrä, ruokintatiheys).

Koeolosuhteet:

— koeastioiden kuvaus: astioiden tyyppi, liuoksen tilavuus, vesikirppujen määrä koeastiaa kohti, koeastioiden (rinnakkaiskokeet) määrä pitoisuutta kohti,

— varasto- ja testiliuosten valmistusmenetelmät (mahdollisen liuottimen tai dispergointiaineen nimi ja pitoisuus on ilmoitettava),

— laimennusvedet: lähde ja veden laatu (pH, kovuus, Ca/Mg-suhde, Na/K-suhde, emäksisyys, johtokyky jne.); synteettisen veden koostumus (jos käytetty),

— inkubaatio-olosuhteet: lämpötila, valon voimakkuus ja jaksoittaisuus, liuennut happi, pH jne.

Tulokset:

— niiden vesikirppujen määrä ja prosentuaalinen osuus, joka immobilisoituivat tai osoittivat haitallisia vaikutuksia (mm. epänormaali käyttäytyminen) kontrolleissa ja kussakin testiryhmässä kunakin havaintoajankohtana, sekä havaittujen vaikutusten luonne,

— vertailuaineella tehdyn testin tulokset ja päivämäärä (jos käytettävissä),

— nimelliset testipitoisuudet sekä tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritetään testiaineen pitoisuus koeastioissa; lisäksi on ilmoitettava menetelmän saantoteho sekä määritysraja,

— kaikki testin aikana tehdyt fysikokemialliset lämpötilan, pH:n ja liuenneet hapen pitoisuuden mittaustulokset,

— EC_{50} immobilisaatiolle 48 tunnin kohdalla, luottamusvälit, EC_{50}:n laskemiseen käytetyn sovitetun mallin graafiset kuvaajat, annos-vastekäyrien kulmakertoimet ja niiden keskivirhe; EC_{50}:n määrittämiseen käytettyjen tilastomenetelmien kuvaus (jos nämä tulokset määritettiin myös 24 tunnin kohdalla, myös ne on ilmoitettava),

— selitykset mahdolliseen testimenetelmästä poikkeamiseen ja vaikuttiko poikkeaminen tuloksiin.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2. EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5. Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. Pp. 65–84.

8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

LIITE 1

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Aine	Pitoisuus
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ammoniakki (ionisoitumaton)	< 1 µg/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä ja polyklooratut bifenyylit	< 50 ng/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

▼B

Liite 2

ESIMERKKEJÄ SOPIVASTA SYNTEETTISESTÄ TESTIVEDESTÄ

ISO-testivesi (1)

Varastoliuokset (yksi aine)		Synteettinen vesi valmistetaan lisäämällä seuraavat määrät varastoliuosta 1 litraan vettä (*)
Aine	1 vesilitraan lisätty määrä (*)	
Kalsiumkloridi $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnesiumsulfaatti $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Natriumbikarbonaatti $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kaliumkloridi KCl	0,23 g	25 ml

(*) Veden on oltava sopivan puhdasta, esimerkiksi deionisoitua, tislattua tai käänteisosmoosilla puhdistettua, ja johtavuus ei saisi olla yli 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Elendt M7- ja M4-viljelynesteet

Totuttaminen Elendt M7- ja M4-viljelynesteeseen

Joissakin laboratorioissa on ollut vaikeuksia, kun ne ovat siirtäneet vesikirput suoraan M4- tai M7-viljelynesteeseen. Siirto onnistuu paremmin totuttamalla vesikirput asteittain uuteen viljelynesteeseen: ensin siirretään entisestä viljelynesteestä 30-prosenttiseen, sitten 60-prosenttiseen ja lopulta 100-prosenttiseen Elendt-viljelynesteeseen. Totuttamisvaiheen pitää mahdollisesti olla jopa kuukauden pituinen.

Valmistelu

Hivenaineet

Ensin valmistetaan erilliset varastoliuokset (I) yksittäisistä mineraaleista sopivan puhtaaseen (esim. deionisoituun, tislattuun tai käänteisosmoosilla puhdistettuun) veteen. Näistä eri varastoliuoksista (I) valmistetaan yksi ainoa varastoliuos (II), jossa on kaikkia hivenaineita (yhdistetty liuos), ts.:

Varastoliuokset I (yksi aine)	Veteen lisätty määrä (mg/l)	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) kertainen	Valmistettaessa yhdistettyä varastoliuosta II lisätään veteen seuraavat määrät varastoliuosta I (ml/l)	
			M4	M7
$H_3\ BO_3$	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2\ .\ 4H_2O$	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25

▼B

Varastoliuokset I (yksi aine)	Veteen lisätty määrä (mg/l)	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) kertainen	Valmistettaessa yhdistettyä varastoliuosta II lisätään veteen seuraavat määrät varastoliuosta I (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2 . 6H_2O$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
$Na_2 MoO_4 . 2H_2O$	1 230	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2 . 2H_2O$	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2 . 6H_2O$	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
$Na_2 SeO_3$	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na_2 EDTA . $2H_2O$	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4 . 7H_2O$	1 991	2 000	—	—

Sekä Na_2 EDTA- että $FeSO_4$-liuokset valmistetaan erikseen, yhdistetään ja autoklavoidaan välittömästi.

Tuloksena on:

21Fe-EDTA-liuos		1 000	20,0	5,0

M4- ja M7-viljelyneste

M4- ja M7-viljelynesteet valmistetaan käyttäen varastoliuosta II, makroravinteita ja vitamiineja seuraavasti:

	Veteen lisätty määrä (mg/l)	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) -kertainen	Viljelynesteen valmistamiseen tarvittava varastoliuoksen määrä (ml/l)	
			M4	M7
Varastoliuos II (yhdistetyt hivenaineet)		20	50	50
Makroravinteiden varastoliuos (yksittäisiä aineita)				
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
$Na_2 SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1

▼B

	Veteen lisätty määrä (mg/l)	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) -kertainen	Viljelynesteen valmistamiseen tarvittava varastoliuoksen määrä (ml/l)	
			M4	M7
Yhdistetty vitamiinien varastoliuos	—	10 000	0,1	0,1
Yhdistetty vitamiinien varastoliuos valmistetaan lisäämällä kaikkia kolmea vitamiinia 1 litraan vettä seuraavasti:				
Tiamiini-hydrokloridi	750	10 000		
Syaani-kobalamiini (B_{12})	10	10 000		
Biotiini	7,5	10 000		

Yhdistetty vitamiinien varastoliuos säilytetään jäädytettynä pienissä erissä. Vitamiinit lisätään viljelynesteeseen vähän ennen käyttöä.

Huom.: Jotta suolat eivät saostuisi lopullista viljelynesteliuosta valmistettaessa, varastoliuokset lisätään 500–800 ml:aan deionisoitua vettä ja täytetään sitten 1 litraksi.

Huom.: M4-viljelynesteen kokoonpanoa koskeva ensimmäinen julkaisuviite on Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

▼M1

C.3. MAKEAN VEDEN LEVIEN JA SYANOBAKTEERIEN KASVUNESTYMISTESTI

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 201, 2006 (1).

1.1 JOHDANTO

Testimenetelmiä tarkistetaan ja päivitetään säännöllisesti tieteen kehityksen perusteella. Testimenetelmää C.2 oli tarkistettava, jotta siihen olisi voitu lisätä uusia lajeja ja jotta olisi voitu täyttää vaaranarviointia ja kemikaalien luokitusta koskevat vaatimukset. Tarkistus perustuu laajaan käytännön kokemukseen, tieteen kehitykseen leviin kohdistuvien myrkyllisyystutkimusten alalla sekä testimenetelmän aiemman version laajaan käyttöön sääntelyssä.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä ja lyhenteitä:

Biomassa: Populaatiossa olevan elävän materiaalin kuivapaino ilmaistuna tiettyä tilavuutta kohden, esimerkiksi milligrammoina levää yhtä litraa testiliuosta kohden. Yleensä ”biomassa” määritellään massaksi, mutta tässä testissä sillä tarkoitetaan massaa tilavuutta kohden. Tässä testissä biomassaa mitataan usein myös epäsuorasti esimerkiksi solumäärien ja fluoresenssin avulla, minkä vuoksi ”biomassa”-termi käsittää myös nämä korvaavat menetelmät.

Variaatiokerroin: Parametrin vaihtelua ilmaiseva dimensioton suure, joka määritellään keskihajonnan ja keskiarvon suhteeksi. Se voidaan ilmaista myös prosenttiarvona. Rinnakkaisten kontrolliviljelmien keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden keskimääräinen variaatiokerroin lasketaan seuraavasti:

1. Keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden variaatiokerroin lasketaan (prosentteina) kunkin rinnakkaisviljelmän päivittäisistä tai jaksoittaisista kasvunopeuksista.

2. Lasketaan kaikkien kohdassa 1 laskettujen arvojen keskiarvo, jotta saadaan rinnakkaisten kontrolliviljelmien päivittäisen tai jaksoittaisen spesifisen kasvunopeuden keskimääräinen variaatiokerroin.

ECx: Testiviljelyaineeseen liuenneen testiaineen pitoisuus, jossa testattavan eliön kasvu vähenee x prosenttia (esimerkiksi 50 prosenttia) määrätyn altistusajan kuluessa (altistusaika on mainittava erikseen, jos se poikkeaa testin kokonaiskestosta tai normaalista kestosta). Jotta kasvunopeudesta ja tuotoksesta johdetut EC-arvot erottuisivat selvästi toisistaan, edellisestä käytetään symbolia ”E_rC” ja jälkimmäisestä symbolia ”E_yC”.

Viljelyaine: Täydellinen synteettinen ravinneliuos, jossa testilevät kasvavat, kun ne altistetaan testiaineelle. Yleensä testiaine on liuennut testiviljelyaineeseen.

Kasvunopeus (**keskimääräinen spesifinen kasvunopeus**): Biomassan logaritminen kasvu altistuksen aikana.

▼M1

Pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC): Pienin testattu pitoisuus, jossa aineella havaitaan olevan tietyn altistusajan kuluessa tilastollisesti merkittävä kasvua vähentävä vaikutus verrattuna kontrolliin (kun $p < 0,05$). Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

Pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC): Lähin LOEC-pitoisuutta pienempi testipitoisuus.

Vastemuuttuja: Muuttuja, jonka avulla arvioidaan myrkyllisyyttä. Vastemuuttuja johdetaan erilaisia laskentamenetelmiä käyttämällä mistä tahansa mitatusta muuttujasta, joka kuvaa biomassaa. Tässä menetelmässä kasvunopeudet ja tuotos ovat vastemuuttujia, jotka on johdettu mittaamalla biomassaa suoraan tai käyttämällä edellä mainittuja korvaavia menetelmiä.

Spesifinen kasvunopeus: Vastemuuttuja, joka määritellään havainnoitavan parametrin (tässä testimenetelmässä biomassan) luonnollisten logaritmien erotuksen ja vastaavan ajanjakson väliseksi suhteeksi.

Tuotos: Altistusajan lopussa mitattu biomassaa ilmaisevan mittausmuuttujan arvo, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu saman mittausmuuttujan arvo.

1.3 TESTIN SOVELTAMISALA

Tätä testimenetelmää voidaan parhaiten soveltaa vesiliukoisiin aineisiin, jotka todennäköisesti pysyvät veteen liuenneina testiolosuhteissa. Testattaessa aineita, jotka ovat haihtuvia, voimakkaasti adsorboivia, värillisiä tai huonosti veteen liukenevia, tai aineita, jotka voivat vaikuttaa testiviljelyaineessa olevien ravinteiden tai kivennäisaineiden saantiin, voi olla tarpeen tehdä tiettyjä mukautuksia tässä kuvattuun menetelmään (esimerkiksi suljettu järjestelmä ja koeastioiden erityisvalmistelu). Kirjallisuusviitteissä (2), (3) ja (4) annetaan ohjeita joistakin sopivista mukautuksista.

1.4 TESTIN PERIAATE

Testin tavoitteena on määrittää testattavan aineen vaikutukset makean veden viherlevien ja/tai syanobakteereiden kasvuun. Eksponentiaalisesti kasvavat koe-eliöt altistetaan testiaineelle panosviljelmissä yleensä 72 tunnin ajan. Vaikka testi on suhteellisen lyhyt, sillä voidaan arvioida useaan sukupolveen kohdistuvia vaikutuksia.

Järjestelmän vasteena on kasvun väheneminen sarjassa leväviljelmiä (testiyksiköitä), jotka on altistettu testiaineen eri pitoisuuksille. Vastetta arvioidaan altistuspitoisuuden funktiona vertaamalla sitä rinnakkaisten, altistumattomien kontrolliviljelmien keskimääräiseen kasvuun. Jotta järjestelmän vaste myrkkyvaikutuksiin ilmenisi kokonaan (optimaalinen herkkyys), viljelmien kasvua ei rajoiteta vaan niiden annetaan kasvaa eksponentiaalisesti olosuhteissa, joissa on riittävästi ravinteita ja valonsaanti on jatkuvaa, kunnes spesifisen kasvunopeuden pieneneminen on mitattavissa.

▼M1

Kasvua ja kasvun estymistä kvantifioidaan mittaamalla leväbiomassa ajan funktiona. Leväbiomassa määritetään kuivapainona tilavuutta kohden, esimerkiksi milligrammoina levää yhtä litraa testiliuosta kohden. Kuivapainoa on kuitenkin vaikea mitata, minkä vuoksi käytetään korvaavia parametreja. Useimmin käytettyjä ovat solumäärät. Muita korvaavia parametreja ovat muun muassa solutilavuus, fluoresenssi ja optinen tiheys. Mitatun korvaavan parametrin ja biomassan välinen muuntokerroin on tunnettava.

Testin loppupisteenä on kasvun estyminen, joka ilmenee biomassan logaritmisesta kasvusta (keskimääräisestä spesifisestä kasvunopeudesta) altistusaikana. Testiliuossarjassa mitattujen keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien avulla määritetään pitoisuus, jossa kasvunopeus vähenee ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan E_rC_x-arvona (esimerkiksi E_rC_{50}).

Käytettäessä tätä menetelmää EU:n sääntelykehyksessä pitäisi tulokset laskea keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien perusteella jäljempänä 2.2 kohdassa selostetuista syistä. Toinen testimenetelmässä käytetty vastemuuttuja on tuotos, jota voidaan tarvita joissakin maissa erityisten sääntelyvaatimusten täyttämiseksi. Tuotoksella tarkoitetaan altistusajan lopussa mitatun biomassan ja altistusajan alussa mitatun biomassan erotusta. Testiliuossarjassa mitatun tuotoksen avulla määritetään pitoisuus, jossa tuotos vähenee ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan E_yC_x-arvona (esimerkiksi E_yC_{50}).

Tilastollisesti voidaan määrittää myös pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) sekä pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC).

1.5 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Testiainetta koskevia tietoja, joista voi olla hyötyä päätettäessä testiolosuhteista, ovat rakennekaava, puhtaus, stabiilius valossa, stabiilius testiolosuhteissa, valonabsorbointiominaisuudet, pK_a ja muuntumistutkimusten tulokset, mukaan luettuna biohajoavuus vedessä.

Testiaineen vesiliukoisuus, oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin (P_{ow}) ja höyrynpaine on tunnettava, ja testiliuoksissa olevan testiaineen kvantifioimiseen tarvitaan validoitu menetelmä, jonka saantoteho ja havaitsemisraja tunnetaan.

1.6 VERTAILUAINE

Testimenetelmä voidaan tarkistaa testaamalla vertailuaine (-aineet), kuten 3,5-dikloorifenoli, jota on käytetty kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (4). Viherleviä viljeltäessä vertailuaineena voidaan käyttää myös kaliumdikromaattia. Vertailuaine olisi hyvä testata vähintään kahdesti vuodessa.

1.7 TESTIN VALIDITEETTI

Jotta testi olisi validi, sen on täytettävä seuraavat vaatimukset:

▼M1

— Biomassan on täytynyt kasvaa kontrolliviljelmissä eksponentiaalisesti vähintään 16-kertaiseksi 72 tunnin testijakson aikana. Tämä vastaa spesifistä kasvunopeutta 0,92 päivää kohden. Useimmin käytetyillä lajeilla kasvunopeus on yleensä huomattavasti suurempi (ks. lisäys 1). Tämä vaatimus ei välttämättä täyty käytettäessä lajeja, jotka kasvavat hitaammin kuin lisäyksessä 1 luetellut lajit. Siinä tapauksessa testijaksoa on pidennettävä, jotta kontrolliviljelmissä saavutettaisiin vähintään 16-kertainen kasvu, ja kasvun on oltava eksponentiaalista koko testijakson ajan. Testijaksoa voidaan lyhentää 48 tuntiin saakka rajoittamattoman eksponentiaalisen kasvun ylläpitämiseksi koko testin ajan, jos kasvukerroin on vähintään 16.

— Kontrolliviljelmien jaksoittaisten spesifisten kasvunopeuksien (72 tunnin testeissä päivät 0–1, 1–2 ja 2–3) keskimääräinen variaatiokerroin (ks. ”Variaatiokerroin” kohdassa 1.2) saa olla enintään 35 prosenttia. Jaksoittaisen spesifisen kasvunopeuden laskemista käsitellään jäljempänä kohdassa 2.2.1. Tämä vaatimus koskee rinnakkaisia kontrolliviljelmiä varten laskettujen variaatiokertoimien keskiarvoa.

— Rinnakkaisten kontrolliviljelmien keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien variaatiokerroin saa olla koko testijakson aikana enintään 7 prosenttia, jos testeissä käytetään lajeja *Pseudokirchneriella subcapitata* ja *Desmodesmus subspicatus*. Käytettäessä muita, harvemmin testattuja lajeja tämä arvo saa olla enintään 10 prosenttia.

1.8 MENETELMÄN KUVAUS

1.8.1 **Välineet**

Koeastioiden ja muiden välineiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Ne on pestävä huolellisesti, jotta mitkään orgaaniset tai epäorgaaniset epäpuhtaudet eivät vaikuttaisi leväkasvuun tai testiliuosten koostumukseen.

Koeastiat ovat yleensä lasipulloja, jotka ovat niin suuria, että viljelmän tilavuus riittää testin aikaisiin mittauksiin ja CO_2:n siirtyminen ilmakehästä on riittävää (ks. kohdan 1.8.9 toinen kappale). Nestetilavuuden täytyy olla riittävän suuri analyyttisiä määrityksiä varten (ks. kohdan 1.8.11 viides kappale).

Lisäksi tarvitaan seuraavia välineitä (kaikkia tai joitakin niistä):

— Viljelylaite: Suosituksena on käyttää kaappia tai kammiota, jossa valittua inkubointilämpötilaa voidaan pitää yllä ± 2 °C:n tarkkuudella.

— Valonmittauslaitteet: On tärkeää muistaa, että valon voimakkuuden mittausmenetelmä ja erityisesti mittausanturin (keräimen) tyyppi vaikuttavat mitattuun arvoon. Mittauksissa olisi mieluimmin käytettävä pyöreää (4 π) mittausanturia (joka reagoi suoraan valoon ja heijastuneeseen valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason ylä- ja alapuolelta) tai 2 π:n mittausanturia (joka reagoi valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason yläpuolelta).

▼M1

— Leväbiomassan määrityslaite: Solumäärä, joka on yleisin leväbiomassan sijasta käytetty parametri, voidaan laskea käyttämällä elektronista hiukkaslaskinta, laskukammiolla varustettua mikroskooppia tai virtaussytometria. Muita biomassan sijasta käytettyjä parametreja voidaan mitata virtaussytometrilla, fluorimetrilla, spektrofotometrilla tai kolorimetrilla. On hyödyllistä laskea solumäärän ja kuivapainon välinen muuntokerroin. Jotta mittaukset onnistuisivat spektrofotometrilla pienissä biomassapitoisuuksissa, voi olla tarpeen käyttää kyvettejä, joissa valotien pituus on vähintään 4 cm.

1.8.2 **Koe-eliöt**

Testissä voidaan käyttää monia kiinnittymättömiä mikrolevä- ja syanobakteerilajeja. Lisäyksessä 1 lueteltujen kantojen on todettu soveltuvan tähän testimenetelmään.

Jos testissä käytetään muita lajeja, niiden kanta ja/tai alkuperä on ilmoitettava. Lisäksi on varmistettava, että testiin valitun levän eksponentiaalista kasvua voidaan pitää yllä testiolosuhteissa koko testijakson ajan.

1.8.3 **Viljelyaine**

Testiä varten suositetaan kahta vaihtoehtoista viljelyainetta: OECD- ja AAP-viljelyainetta. Niiden koostumus esitetään lisäyksessä 2. On syytä huomata, että näiden kahden viljelyaineen alkuperäinen pH-arvo ja puskurikapasiteetti (joka säätelee pH:n kasvua) ovat erilaisia, minkä vuoksi ne voivat antaa erilaisia tuloksia varsinkin, kun testataan ionisoivia aineita.

Viljelyaineita voidaan joutua mukauttamaan esimerkiksi silloin, kun testataan metalleja ja kelatoivia aineita tai kun testaus suoritetaan erilaisilla pH-arvoilla. Mukautetun viljelyaineen käyttö on perusteltava ja kuvattava yksityiskohtaisesti (3)(4).

1.8.4 **Biomassan alkupitoisuus**

Biomassan alkupitoisuuden on oltava sama kaikissa testiviljelmissä ja niin pieni, että kasvu on eksponentiaalista koko inkubointiajan ilman, että ravinteet uhkaavat loppua. Biomassan alkupitoisuus saa olla enintään 0,5 mg/l kuivapainona ilmaistuna. Suosituksena on käyttää seuraavia solujen alkupitoisuuksia:

Pseudokirchneriella subcapitata	5×10^3–10^4	solua/ml
Desmodesmus subspicatus	2–5×10^3	solua/ml
Navicula pelliculosa	10^4	solua/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	solua/ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4–10^5	solua/ml

1.8.5 **Testiaineen pitoisuudet**

Pitoisuusalue, jolla vaikutuksia todennäköisesti esiintyy, voidaan määrittää alueenmäärityskokeiden avulla. Varsinaista testiä varten on valittava vähintään viisi pitoisuutta, jotka muodostavat geometrisen sarjan, jonka suhdeluku on enintään 3,2. Suurempikin suhdeluku voi olla aiheellinen, jos testiaineella saadaan laakea pitoisuus-vastekäyrä. Pitoisuussarjan tulisi käsittää pitoisuusalue, jolla levän kasvunopeus hidastuu 5–75 prosenttia.

▼M1

1.8.6 **Toistot ja kontrollit**

Testiin on kuuluttava kolme toistoa kutakin pitoisuutta kohden. Jos NOEC-pitoisuutta ei tarvitse määrittää, koejärjestelyä voidaan muuttaa lisäämällä pitoisuuksien määrää ja vähentämällä toistojen määrää pitoisuutta kohden. Kontrollitoistoja on oltava vähintään kolme, ja niitä on mieluimmin tehtävä kaksi kertaa enemmän kuin kutakin testipitoisuutta kohden tehtyjä toistoja.

Testiaineen pitoisuuksien analyyttisiä määrityksiä varten voidaan valmistaa erillinen testiliuossarja (ks. kohdan 1.8.11 neljäs ja kuudes kappale).

Jos testiaine on liuotettava liuottimella, koejärjestelyyn on kuuluttava ylimääräisiä kontrolliviljelmiä, jotka sisältävät liuotinta samana pitoisuutena kuin testiviljelmät.

1.8.7 **Inokulaattiviljelmän valmistaminen**

Jotta testissä käytettävät levät sopeutuisivat testiolosuhteisiin ja olisivat eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa, kun ne siirrostetaan testiliuoksiin, testiviljelyaineeseen valmistetaan 2–4 päivää ennen testin alkua inokulaattiviljelmä. Leväbiomassaa on säädeltävä siten, että eksponentiaalinen kasvu jatkuu inokulaattiviljelmässä testin alkuun saakka. Inokulaattiviljelmää inkuboidaan samoissa olosuhteissa kuin testiviljelmiä. Biomassan kasvu inokulaattiviljelmässä mitataan sen varmistamiseksi, että kasvu vastaa testissä käytettävän kannan normaalia kasvua viljelyolosuhteissa. Lisäyksessä 3 annetaan yksi esimerkki levänviljelymenetelmistä. Inokulaattiviljelmässä voidaan joutua käynnistämään toinen lisäysvaihe, jotta testin aikana ei tapahtuisi synkronista solunjakautumista.

1.8.8 **Testiliuosten valmistaminen**

Viljelyaineen pitoisuuden ja testilevien biomassan alkupitoisuuden on oltava samat kaikissa testiliuoksissa. Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan yleensä sekoittamalla testiaineen kantaliuos viljelyaineen ja inokulaattiviljelmän kanssa. Kantaliuokset valmistetaan yleensä liuottamalla testattava aine testiviljelyaineeseen.

Liuottimia, kuten asetonia, t-butyylialkoholia ja dimetyyliformamidia, voidaan käyttää kantoaineina, kun testiviljelyaineeseen lisätään huonosti veteen liukenevia aineita (2)(3). Liuottimen pitoisuus saa olla enintään 100 µl/l, ja kaikkiin testisarjan viljelmiin (kontrolliviljelmät mukaan luettuina) on lisättävä samanpitoista liuotinta.

1.8.9 **Inkubointi**

Koeastiat suljetaan ilmaa läpäisevillä tulpilla. Astioita ravistellaan ja ne asetetaan viljelylaitteeseen. Niitä on ravisteltava ja sekoitettava koko testin ajan, jotta levät pysyisivät suspendoituneina ja CO_2:n siirtyminen liuoksiin helpottuisi. Viljelmien lämpötila pidetään alueella 21–24 °C (säätötarkkuus ± 2 °C). Käytettäessä muita kuin lisäyksessä 1 lueteltuja lajeja, kuten trooppisia lajeja, lämpötila voi olla korkeampikin, kunhan validiteettivaatimukset täyttyvät. Suositeltavaa on sijoittaa pullot satunnaiseen järjestykseen ja vaihtaa niiden paikkaa inkubaattorissa päivittäin.

▼M1

Yleensä kontrolliviljelyaineen pH-arvo saa vaihdella kokeen aikana enintään 1,5 yksikköä. Kun on kyse metalleista ja yhdisteistä, jotka ionisoituvat osittain jotakuinkin samassa pH:ssa kuin testissä, pH-muutoksia voidaan joutua rajoittamaan tarkkojen ja toistettavien tulosten saamiseksi. Muutokset voidaan rajoittaa teknisesti alle 0,5 yksikköön varmistamalla, että CO_2:ta siirtyy riittävän nopeasti ilmasta testiliuokseen. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi lisäämällä ravistelunopeutta. Toinen mahdollisuus on vähentää CO_2:n tarvetta pienentämällä biomassan alkupitoisuutta tai lyhentämällä testin kestoa.

Pintaa, jolla viljelmät inkuboidaan, on valaistava tasaisella loistevalolla, esimerkiksi kylmänvalkoisella tai päivänvalon kaltaisella valolla. Levien ja syanobakteerien valontarpeet vaihtelevat eri kantojen välillä. Valon voimakkuus on valittava koe-eliön mukaan. Suositeltuja viherlevälajeja varten valon voimakkuus on valittava siten, että se on testiliuosten tasolla 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, kun se mitataan sopivalla mittausanturilla fotosynteesille suotuisalla aallonpituusalueella 400–700 nm. Eräät lajit, erityisesti *Anabaena flos-aquae*, kasvavat hyvin heikommassakin valaistuksessa ja voivat vahingoittua suurilla valon voimakkuuksilla. Tällaisia lajeja varten keskimääräinen valon voimakkuus on valittava alueelta 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Jos valonmittauslaitteet on kalibroitu lux-yksikköä varten, suositeltu valonvoimakkuus 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ vastaa suunnilleen kylmänvalkoisen valon voimakkuusaluetta 4 440–8 880 lux.) Valon voimakkuus saa vaihdella enintään ± 15 prosenttia inkubointialueen keskimääräisestä valon voimakkuudesta.

1.8.10 **Testin kesto**

Testi kestää yleensä 72 tuntia. Se voi kestää myös lyhyemmän tai pitemmän ajan, jos kaikki kohdassa 1.7 esitetyt validiteettivaatimukset täyttyvät.

1.8.11 **Mittaukset ja analyyttiset määritykset**

Kussakin pullossa oleva leväbiomassa määritetään ainakin kerran päivässä testijakson aikana. Jos mittauksissa käytetään testiliuoksesta pipetoituja pieniä tilavuuksia, niitä ei saa korvata vastaavilla tilavuuksilla.

Biomassa mitataan laskemalla solut manuaalisesti mikroskoopin avulla tai käyttämällä elektronista hiukkaslaskinta (solunlaskenta ja/tai biovolyymin määritys). Muutkin tekniikat, kuten virtaussytometria, klorofyllin *in vitro*- tai *in vivo* -fluoresenssin määritys (6)(7) tai optisen tiheyden määritys, ovat sallittuja, jos voidaan osoittaa, että ne korreloivat tyydyttävästi biomassan kanssa testin biomassa-arvoilla.

Liuosten pH mitataan testin alussa ja lopussa.

Jos käytettävissä on analyysimenetelmä, jolla testiaine voidaan määrittää testissä käytetyllä pitoisuusalueella, testiliuokset on analysoitava, jotta voidaan tarkistaa alkupitoisuudet sekä altistuspitoisuuksien säilyminen testin aikana.

▼M1

Jos altistuspitoisuudet todennäköisesti vaihtelevat alle 20 prosenttia nimellisarvoista testin aikana, voi olla riittävää analysoida testiaineen pitoisuus testin alussa ja lopussa pienessä ja suuressa testipitoisuudessa sekä pitoisuudessa, joka on lähellä oletettua EC_{50}-arvoa. Kaikkien testipitoisuuksien analysointia testin alussa ja lopussa suositellaan silloin, kun pitoisuudet eivät pysyttele 80:n ja 120 prosentin välillä nimellispitoisuudesta. Jos testiaine on haihtuva, epästabiili tai voimakkaasti adsorboivia, suosituksena on ottaa analysoitaviksi lisänäytteitä 24 tunnin välein altistusajan kuluessa, jotta testiaineen häviö olisi helpommin määritettävissä. Tällaisia aineita varten tarvitaan ylimääräisiä toistoja. Kaikissa tapauksissa testiaineen pitoisuudet tarvitsee määrittää vain yhdestä toistossa käytetystä astiasta (tai kaikkien toistoissa käytettyjen astioiden yhdistetystä sisällöstä) kutakin testipitoisuutta kohden.

Testiviljelyaineita, jotka on valmistettu erityisesti altistuspitoisuuksien analysoimiseksi testin aikana, on käsiteltävä samalla tavalla kuin testaukseen käytettyjä liuoksia, toisin sanoen niihin on siirrostettava leviä ja niitä on inkuboitava samoissa olosuhteissa. Jos liuenneen testiaineen pitoisuus on analysoitava, voi olla tarpeen erottaa levät viljelyaineesta. Levien erottaminen on mieluimmin tehtävä sentrifugoimalla käyttämällä pientä g-voimaa, joka riittää kuitenkin niiden erottamiseen.

Jos on näyttöä siitä, että testattavan aineen pitoisuus on pysynyt tyydyttävästi ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten analysointi voi perustua nimellispitoisuuksiin tai mitattuihin alkupitoisuuksiin. Jos pitoisuus poikkeaa enemmän kuin ± 20 prosenttia nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta, tulosten analysoinnin on perustuttava pitoisuuksien geometriseen keskiarvoon altistuksen aikana tai malleihin, jotka kuvaavat testiaineen pitoisuuden vähenemistä (3)(8).

Leväkasvun estymistesti on dynaamisempi testijärjestelmä kuin useimmat muut lyhytaikaiset kokeet, joilla testataan aineiden myrkyllisyyttä vesieliöille. Sen vuoksi todellisten altistuspitoisuuksien määritys voi olla vaikeaa varsinkin, kun on kyse adsorboituvista aineista, joita testataan pienillä pitoisuuksilla. Jos aine tällaisissa tapauksissa katoaa liuoksesta adsorboitumalla kasvavaan leväbiomassaan, se ei kuitenkaan merkitse sitä, että se olisi kadonnut koko testijärjestelmästä. Analysoitaessa testin tuloksia on tarkistettava, liittyykö testiaineen pitoisuuden väheneminen testin aikana kasvun estymisen vähenemiseen. Jos näin on, voidaan harkita sopivan mallin käyttöä kuvaamaan testiaineen pitoisuuden pienemistä (8). Muussa tapauksessa voi olla aiheellista analysoida tuloksia (nimellisten tai mitattujen) alkupitoisuuksien pohjalta.

1.8.12 **Muut havainnot**

Mikroskoopin avulla on varmistettava, että inokulaattiviljelmä näyttää normaalilta ja terveeltä, sekä tutkittava testin lopussa levissä esiintyvät epänormaaliudet (jotka voivat johtua altistumisesta testiaineelle).

▼M1

1.8.13 **Rajatesti**

Joissakin tapauksissa, esimerkiksi silloin, kun alustava testi osoittaa, että testiaineella ei ole myrkkyvaikutuksia pitoisuusarvoon 100 $mg \cdot l^{-1}$ saakka tai siihen liukoisuusrajaan asti, joka testiaineella on testiviljelyaineessa (sen mukaan, kumpi näistä on pienempi), voidaan tehdä rajatesti, jossa verrataan yhden kontrolliryhmän ja yhden käsitellyn ryhmän vasteita (pitoisuudessa 100 $mg \cdot l^{-1}$ tai liukoisuusrajaa vastaavassa pitoisuudessa). On erittäin suotavaa analysoida altistuspitoisuus rajatestin tueksi. Kaikki edellä kuvatut testiolosuhteet ja validiteettivaatimukset koskevat myös rajatestiä, lukuun ottamatta käsiteltyjen toistojen määrää, jonka on oltava vähintään kuusi. Kontrolli- ja käsitellyn ryhmän vastemuuttujia voidaan analysoida Studentin t-testin kaltaisella tilastotutkimuksella, jossa verrataan keskiarvoja. Jos näiden kahden ryhmän varianssit eivät ole yhtä suuria, on tehtävä erisuuruisiin variansseihin mukautettu t-testi.

1.8.14 **Muunnos voimakkaan värillisille aineille**

Säteilytyksen (valon voimakkuuden) pitäisi olla tässä koemenetelmässä käytetyn alueen korkeimmassa päässä, vähintään 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Valotietä on lyhennettävä vähentämällä koeliuosten tilavuutta (5–25 ml).

Näytteitä on ravistettava riittävästi, jotta levät altistuvat hyvin tiheään säteilytykselle viljelmän pinnalla.

2. **TIEDOT**

2.1 KASVUKÄYRIEN PIIRTÄMINEN

Koeastioissa oleva biomassa voidaan ilmaista mittauksissa käytetyn korvaavan parametrin (esimerkiksi solumäärän ja fluoresenssin) yksikkönä.

Biomassan määritetty pitoisuus testi- ja kontrolliviljelmissä esitetään kasvukäyrien piirtämistä varten taulukkona, josta ilmenevät myös testiaineen pitoisuudet ja mittausajankohdat, jotka on rekisteröity vähintään täysien tuntien tarkkuudella. Tässä ensimmäisessä vaiheessa voi olla hyödyllistä käyttää sekä logaritmiasteikkoja että lineaarisia asteikkoja, mutta logaritmisasteikot ovat pakollisia ja antavat yleensä paremman kuvan kasvun vaihteluista testijakson aikana. On syytä huomata, että kun eksponentiaalista kasvua kuvataan logaritmiasteikolla, tuloksena on suora viiva, ja viivan kaltevuus ilmaisee spesifisen kasvunopeuden.

Käyrien avulla tutkitaan, kasvavatko kontrolliviljelmät oletetulla nopeudella eksponentiaalisesti koko testin ajan. Kaikkia datapisteitä ja käyrien muotoa tarkastellaan kriittisesti, ja raakatiedot ja menetelmät tarkistetaan mahdollisten virheiden havaitsemiseksi. Erityisesti tarkistetaan ne datapisteet, jotka näyttävät poikkeavan systemaattisen virheen vuoksi. Jos havaitaan ilmeisiä menetelmävirheitä ja/tai niitä pidetään hyvin todennäköisinä, kyseinen datapiste merkitään vieraaksi havainnoksi eikä sitä oteta huomioon myöhemmässä tilastoanalyysissä. (Jos leväpitoisuus on nolla yhdessä kahdesta tai kolmesta toistoissa käytetyssä astiassa, tämä voi olla merkki siitä, että levien siirrostamista astiaan ei ole tehty oikein tai astiaa ei ole puhdistettu kunnolla). Testiraportissa on perusteltava selvästi, minkä vuoksi datapiste on hylätty vieraana havaintona. Hyväksyttäviä syitä ovat ainoastaan (harvinaiset) menetelmävirheet eikä pelkästään huono tarkkuus. Tämäntyyppisissä ongelmissa ei ole kovin hyödyllistä yrittää tunnistaa vieraita havaintoja tilastomenetelmien avulla, eivätkä tällaiset menetelmät voi korvata asiantuntijan arviota. Vieraat havainnot (jotka on merkitty sellaisiksi) tulisi säilyttää niiden datapisteiden joukossa, jotka merkitään myöhemmin graafisiin tai taulukkomuotoisiin esityksiin.

▼M1

2.2 VASTEMUUTTUJAT

Testin tarkoituksena on määrittää testiaineen vaikutukset levien kasvuun. Tässä testimenetelmässä kuvataan kahta eri vastemuuttujaa, koska jäsenvaltiot suosivat erilaisia käytänteitä ja asettavat erilaisia sääntelyvaatimuksia. Jotta testitulokset voitaisiin hyväksyä kaikissa jäsenvaltioissa, vaikutuksia olisi arvioitava käyttämällä molempia vastemuuttujia a ja b, joita kuvataan jäljempänä.

a) Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus: tämän vastemuuttujan laskentaperusteena on biomassan logaritminen kasvu päivää kohden testijakson aikana.

b) Tuotos: tällä vastemuuttujalla tarkoitetaan testin lopussa mitattua biomassaa, josta on vähennetty testin alussa mitattu biomassa.

Käytettäessä tätä menetelmää EU:n sääntelykehyksessä pitäisi tulokset laskea keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien perusteella jäljempänä selostetuista syistä. On syytä huomata, että näiden kahden vastemuuttujan avulla lasketut myrkyllisyysarvot eivät ole vertailukelpoisia, mikä on otettava huomioon käytettäessä testin tuloksia. Jos testiolosuhteet ovat tämän testimenetelmän mukaiset, keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen perustuvat EC_x-arvot (E_rC_x) ovat yleensä suurempia kuin tuotokseen perustuvat arvot (E_yC_x), mikä johtuu niiden matemaattisista perusteista. Tätä ei siis pidä tulkita siten, että näiden kahden vastemuuttujan herkkyydet olisivat erilaiset, vaan arvojen välinen ero on puhtaasti matemaattinen. Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus perustuu yleiseen kasvumalliin, joka kuvaa levien eksponentiaalista kasvua rajoittamattomissa viljelmissä, joista toksisuus arvioidaan kasvunopeuteen kohdistuvien vaikutusten perusteella ottamatta huomioon kontrollin spesifisen kasvunopeuden absoluuttista tasoa, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuutta tai testin kestoa. Tuotosta kuvaavaan vastemuuttujaan perustuvat tulokset riippuvat sen sijaan kaikista näistä muista muuttujista. E_yC_x riippuu kussakin testissä käytetyn levälajin spesifisestä kasvunopeudesta ja suurimmasta spesifisestä kasvunopeudesta, joka voi vaihdella eri lajien ja jopa eri leväkantojen välillä. Tätä vastemuuttujaa ei saa käyttää vertailtaessa eri levälajien tai eri kantojenkaan herkkyyttä myrkyllisille aineille. Vaikka tieteen kannalta on parempi arvioida myrkyllisyyttä keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden perusteella, tähän testimenetelmään on otettu mukaan myös tuotokseen perustuvat myrkyllisyyden arvioinnit, koska niillä voidaan täyttää eräiden maiden nykyiset sääntelyvaatimukset.

2.2.1 **Keskimääräinen kasvunopeus**

Tietyn ajanjakson keskimääräinen spesifinen kasvunopeus lasketaan biomassan logaritmisena kasvuna soveltamalla seuraavaa kaavaa kuhunkin kontrolli- ja käsittelyryhmän astiaan:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (päivä}^{-1}\text{)}$$

jossa

μ_{i-j} keskimääräinen spesifinen kasvunopeus aikavälillä *i–j*

X_i biomassa hetkellä *i*

X_j biomassa hetkellä *j*.

▼M1

Kullekin testiryhmälle ja kontrolliryhmälle lasketaan kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen.

Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus lasketaan koko testin ajalta (yleensä päivästä 0 päivään 3) käyttämällä lähtöarvona siirrostetun biomassan nimellisarvoa mitatun lähtöarvon sijasta, koska näin saadaan yleensä parempi tarkkuus. Biomassan mitattua alkupitoisuutta voidaan käyttää, jos inokulaatin pieni biomassa voidaan määrittää riittävän tarkasti biomassan mittauslaitteella (esimerkiksi virtaussytometrilla). Lisäksi määritetään jaksoittainen kasvunopeus, joka saadaan laskemalla spesifiset kasvunopeudet kultakin päivältä testin aikana (päivät 0–1, 1–2 ja 2–3), ja tutkitaan, pysyykö kontrolliryhmän kasvunopeus vakiona (ks. validiteettivaatimukset, kohta 1.7). Jos spesifinen kasvunopeus on huomattavasti pienempi ensimmäisenä päivänä kuin spesifisten kasvunopeuksien keskiarvo, se voi olla merkki viivevaiheesta. Vaikka viivevaihe voidaan minimoida ja poistaa käytännössä kokonaan kontrolliviljelmistä esiviljelmän asianmukaisella lisäyksellä, testiaineelle altistetuissa viljelmissä viivevaihe voi osoittaa toipumista toksisuuden aiheuttamasta alkustressistä tai vähentynyttä altistumista, joka johtuu testiaineen häviämisestä (esimerkiksi sorptiosta levämassaan) alkuvaiheen altistumisen jälkeen. Tällöin voidaan tarkastella jaksoittaista kasvunopeutta, jonka avulla voidaan arvioida testiaineen vaikutuksia altistusaikana. Merkittävät erot jaksoittaisen kasvunopeuden ja keskimääräisen kasvunopeuden välillä osoittavat, että kasvu poikkeaa jatkuvasta eksponentiaalisesta kasvusta, jolloin kasvukäyriä on syytä tarkastella lähemmin.

Kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen kussakin käsitellyssä toistossa lasketaan seuraavan kaavan avulla:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

jossa

$\%I_r$ keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen

μ_C keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden (μ) keskiarvo kontrolliryhmässä

μ_T keskimääräinen spesifinen kasvunopeus käsitellyssä toistossa.

Jos testiliuosten valmistamisessa käytetään liuottimia, kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen on laskettava liuottimia sisältävistä kontrolliviljelmistä eikä niistä kontrolliviljelmistä, joissa ei ole liuottimia.

2.2.2 **Tuotos**

Tuotos lasketaan vähentämällä testin lopussa mitatusta biomassasta testin alussa mitattu biomassa kontrolli- ja käsittelyryhmän kunkin astian osalta. Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen. Tuotoksen prosentuaalinen estyminen ($\%\ I_y$) voidaan laskea kutakin käsiteltyä toistoa varten seuraavasti:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼M1

jossa

$\%\ I_y$ tuotoksen prosentuaalinen estyminen

Y_C tuotoksen keskiarvo kontrolliryhmässä

Y_T tuotoksen arvo käsitellyssä toistossa.

2.3 PITOISUUS-VASTEKÄYRÄN PIIRTÄMINEN

Prosentuaalinen estyminen merkitään graafisesti suhteessa testiaineen pitoisuuden logaritmiin. Näin saatuja pisteitä tarkastellaan huolellisesti ottamatta huomioon datapisteitä, joita pidettiin ensimmäisessä vaiheessa vieraina havaintoina. Datapisteiden kautta vedetään tasaisesti muuttuva viiva joko silmämääräisesti tai interpoloimalla tietokoneen avulla, jotta pitoisuuden ja vasteen suhteesta saataisiin alustava käsitys. Tämän jälkeen käytetään tarkempaa menetelmää, mieluimmin tietokonepohjaista tilastomenetelmää. Sen perusteella, mihin tietoja aiotaan käyttää, mikä on niiden laatu (tarkkuus) ja määrä ja mitä välineitä on käytettävissä niiden analysoimiseen, voidaan päättää, että tietojen analysointi lopetetaan tähän vaiheeseen (mikä on joskus hyvin aiheellisestakin), ja ainoastaan lukea keskeiset arvot EC_{50} ja EC_{10} (ja/tai EC_{20}) silmämääräisesti piirretyltä käyrältä (ks. myös jäljempänä oleva kohta stimuloivista vaikutuksista). Päteviä syitä olla käyttämättä tilastomenetelmää ovat muun muassa seuraavat syyt:

— Vaikka tietoja käsiteltäisiin tietokoneistetulla menetelmällä, tulokset eivät olisi sen luotettavampia kuin jos tiedot olisi annettu asiantuntijan arvioitaviksi. Tällaisissa tapauksissa on jopa mahdollista, että eräillä tietokoneohjelmilla ei saada minkäänlaista luotettavaa tulosta (esimerkiksi sen vuoksi, että iteraatiot eivät konvergoidu).

— Tietokoneohjelmilla ei pystytä käsittelemään kunnolla stimuloinnin aiheuttamia kasvuvasteita (ks. jäljempänä).

2.4 TILASTOMENETELMÄT

Tavoitteena on saada kvantitatiivinen pitoisuus–vaste-suhde regressioanalyysin avulla. Painotettua lineaarista regressiota voidaan käyttää sen jälkeen, kun vastetiedoille on tehty linearisoiva muunnos – esimerkiksi probitti-, logitti- tai Weibull-yksiköiksi (9) – mutta suositeltavampaa on käyttää epälineaarisia regressiomenetelmiä, joilla voidaan paremmin käsitellä tiedoissa väistämättä esiintyviä epäsäännöllisyyksiä sekä poikkeamia tasaisista jakaumista. Lähestyttäessä tilaa, jossa kasvu ei esty ollenkaan tai estyminen on täydellistä, linearisoiva muunnos voi suurentaa epäsäännöllisyyksiä ja haitata siten analyysiä (9). On syytä huomata, että standardianalyysimenetelmät, joissa käytetään probitti-, logitti- tai Weibull-muunnoksia, on tarkoitettu dikotomisia tietoja varten (kun vasteita on kaksi, esimerkiksi kuolleisuus tai eloonjääminen), minkä vuoksi niitä on mukautettava, jos niitä aiotaan käyttää kasvu- tai tuotostietojen analysointiin. Kirjallisuusviitteissä (10), (11) ja (12) kuvataan erityismenetelmiä, joilla EC_x-arvot voidaan määrittää jatkuvista tiedoista. Epälineaarisen regressioanalyysin käyttöä käsitellään tarkemmin lisäyksessä 4.

▼M1

Kunkin vastemuuttujan analysoimiseksi käytetään pitoisuus–vastesuhdetta, jonka avulla lasketaan EC_x-arvojen piste-estimaattit. Jokaiselle estimaatille on määritettävä 95 prosentin luottamusväli, jos se on mahdollista. Vastetietojen ja regressiomallin välinen yhteensopivuuden aste on arvioitava joko graafisesti tai tilastollisesti. Regressionanalyysi on tehtävä käyttämällä yksittäisiä toistojen vasteita eikä käsittelyryhmien keskiarvoja. Jos epälineaariseen käyrän sovitus on vaikeaa tai mahdotonta, koska tiedot ovat liian hajallaan, ongelma voidaan kiertää tekemällä regressio ryhmien keskiarvoille, mikä on käytännöllinen tapa vähentää mahdollisten vieraiden havaintojen vaikutusta. Tämän vaihtoehdon käyttö on mainittava testiraportissa tavanomaisesta menetelmästä poikkeavana keinona, jota on käytetty sen vuoksi, että käyrän sovittaminen yksittäisiin toistoihin ei antanut hyvää tulosta.

EC_{50}-estimaatit ja luottamusvälit voidaan saada myös käyttämällä lineaarista interpolointia bootstrap-menetelmän kanssa (13), jos käytettävissä olevat regressiomallit tai -menetelmät eivät sovellu kyseisten tietojen käsittelyyn.

Jotta voidaan arvioida LOEC-pitoisuus ja siten myös NOEC-pitoisuus sekä testiaineen vaikutukset kasvunopeuteen, käsiteltyjen liuosten keskiarvoja on verrattava varianssianalyysitekniikoiden avulla (ANOVA). Sen jälkeen on verrattava kunkin pitoisuuden keskiarvoa kontrolliryhmän keskiarvoon käyttämällä sopivaa moniulotteista vertailumenetelmää tai trenditestimenetelmää. Dunnettin tai Williamsin testi voi olla käyttökelpoinen (14)(15)(16)(17)(18). Lisäksi on arvioitava, pitääkö ANOVA-oletus varianssin homogeenisuudesta paikkansa. Arviointi voidaan tehdä graafisesti tai virallisen testin avulla (18). Sopivia testejä ovat Levenen ja Bartlettin testit. Jos oletus varianssin homogeenisuudesta ei pidä paikkaansa, tilanne on joskus korjattavissa tietojen logaritmimuunnoksella. Jos varianssin heterogeenisuus on erittäin suuri eikä se ole korjattavissa muunnoksella, on harkittava analysointia sellaisilla menetelmillä kuin Jonckheeren alaspäin askeltava trenditesti. Kirjallisuusviitteessä (12) annetaan lisäohjeita NOEC-arvon määrittämisestä.

Tieteen viimeaikaisen kehityksen perusteella on suositeltu, että NOEC-käsitteestä luovuttaisiin ja se korvattaisiin regressioanalyysiin perustuvilla EC_x:n piste-estimaateilla. Sopivaa x:n arvoa ei ole vielä vahvistettu tätä levätestiä varten. Sopivalta vaikuttaisi väli 10–20 prosenttia (valitun vastemuuttujan mukaan), ja suositeltavaa on ilmoittaa sekä EC_{10}- että EC_{20}-arvo.

2.5 KASVUN EDISTYMINEN

Pienissä pitoisuuksissa havaitaan joskus kasvun edistymistä (negatiivista estymistä). Tämä voi johtua joko hormesis-vaikutuksesta (”toksisuudesta johtuva kasvun edistyminen”) tai stimuloivien kasvutekijöiden lisäämisestä testiaineen kanssa testissä käytettyyn minimaaliseen viljelyaineeseen. On muistettava, että epäorgaanisten ravinteiden lisäämisellä ei pitäisi olla suoranaista vaikutusta, koska testiliuoksessa on oltava ravinteita ylimäärin koko testin ajan. Pieniannoksinen stimulointi voidaan yleensä jättää huomioimatta EC_{50}-arvon laskemisessa, jollei se ole hyvin merkittävää. Jos se on merkittävää tai jos EC_x-arvo on laskettava pientä x:n arvoa varten, voi olla tarpeen käyttää erityismenetelmiä. Stimuloinnin aiheuttamien vasteiden poistamista tietojen analysoinnista olisi vältettävä mahdollisuuksien mukaan, ja jos käytettävissä oleva käyränsovitusohjelmisto ei pysty käsittelemään vähäistä stimulointia, voidaan käyttää lineaarista interpolointia yhdessä bootstrap-menetelmän kanssa. Jos stimulointi on hyvin merkittävää, voidaan harkita hormesis-mallin käyttöä (19).

▼**M1**

2.6 MUUSTA KUIN TOKSISUUDESTA JOHTUVA KASVUN ESTYMINEN

Valoa absorboivat testimateriaalit voivat hidastaa kasvunopeutta, koska varjostus vähentää käytettävissä olevan valon määrää. Tällaiset fysikaaliset vaikutukset olisi erotettava myrkkyvaikutuksista muuttamalla testiolosuhteita, ja fysikaalisista vaikutuksista olisi raportoitava erikseen. Tästä annetaan ohjeita kirjallisuusviitteissä (2) ja (3).

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, joilla on merkitystä, muun muassa vesiliukoisuuden raja-arvo,

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan luettuna puhtaus.

Koelajit:

— kanta, sen toimittaja tai lähde ja viljelyolosuhteet.

Testiolosuhteet:

— testin alkamispäivä ja kesto,

— koejärjestelyn kuvaus: koeastiat, viljelmien tilavuudet ja biomassan tiheys testin alussa,

— viljelyaineen koostumus,

— testipitoisuudet ja toistot (esimerkiksi toistojen määrä, testipitoisuuksien määrä ja testissä käytetty geometrinen porrastus),

— kuvaus testiliuosten valmistamisesta, muun muassa liuottimien käyttö,

— viljelylaite,

— valon voimakkuus ja laatu (lähde, homogeenisuus),

— lämpötila,

— testatut pitoisuudet: nimelliset testipitoisuudet ja mahdolliset tulokset analyyseistä, joilla on määritetty testiaineen pitoisuus koeastioissa. Menetelmän saantoteho ja määritysraja testimatriisissa on ilmoitettava,

— kaikki poikkeamat tästä testimenetelmästä,

— biomassan määritysmenetelmä sekä näyttö mitatun parametrin ja kuivapainon korrelaatiosta.

Tulokset:

— pH-arvot kokeen alussa ja lopussa kaikista käsittelyistä,

— kussakin pullossa oleva biomassa kunakin mittausajankohtana sekä biomassan mittausmenetelmä,

▼M1

— kasvukäyrät (biomassa ajan funktiona),

— kunkin käsitellyn toiston lasketut vastemuuttujat sekä toistojen keskiarvot ja variaatiokerroin,

— pitoisuuden ja vaikutuksen suhteen graafinen esitys,

— myrkyllisyyden arvioinnit vastemuuttujien osalta, esimerkiksi EC_{50}, EC_{10} ja EC_{20}, ja vastaavat luottamusvälit; LOEC- ja NOEC-pitoisuudet, jos ne on laskettu, ja niiden määrityksessä käytetyt tilastomenetelmät,

— jos on käytetty ANOVA-analyysiä, havaittavissa olevan vaikutuksen suuruus (esimerkiksi vähiten merkitsevä erotus),

— mahdollinen kasvun edistyminen käsitellyissä liuoksissa,

— muut havaitut vaikutukset, esimerkiksi levien morfologiset muutokset,

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

4. **KIRJALLISUUS**

(1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

(2) ISO 1998: Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.

(3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.

(4) ISO 1998: Water quality – Sampling – Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

(5) ISO 1993: Water quality – Algal growth inhibition test. ISO 8692.

(6) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31: 2525–2531.

(7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), s. 919–925.

(8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073–2079.

(9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713–718.

▼**M1**

(10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157–167.

(11) Bruce, R.D. and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485–1494.

(12) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USEPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096–1121.

(15) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

(16) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103–117.

(17) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.

(18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93–96.

▼M1

Lisäys 1

Testiin sopivat kannat

Viherlevät

— *Pseudokirchneriella subcapitata* (aiemmin *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

— *Desmodesmus subspicatus* (aiemmin *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Piilevät

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Syanobakteerit

— *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Kantojen alkuperä

Suositellut kannat ovat saatavissa vain yhtä levää sisältävinä viljelminä seuraavista kokoelmista (jotka luetellaan aakkosjärjestyksessä):

ATCC: American Type Culture Collection

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110–2209

USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa

Institute of Freshwater Ecology,

Windermere Laboratory

Far Sawrey, Amblerside

Cumbria

LA22 0LP

UK

Sammlung von Algenkulturen

Albrecht-von-Haller-Institut

Universität Göttingen

Nikolausberger Weg 18

3400 Göttingen

GERMANY

UTEX Culture Collection of Algae

Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

the University of Texas at Austin

Austin, Texas 78712

USA

▼M1

Suositeltujen lajien ulkonäkö ja ominaisuudet

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Ulkonäkö	Kaarevia ja kierteisiä yksittäisiä soluja	Soikeita, yleensä yksittäisiä soluja	Sauvoja	Soikeiden solujen muodostamia ketjuja	Sauvoja
Koko (pituus × leveys) µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Solutilavuus (μm^3/solu)	40–60 (1)	60–80 (1)	40–50 (1)	30–40 (1)	2,5 (2)
Solujen kuivapaino (mg/solu)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$1–2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Kasvunopeus (3) (päivä$^{-1}$)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

(1) Elektronisella hiukkaslaskimella mitattuna.
(1) Koon perusteella laskettuna.
(3) Yleisimmin havaittu kasvunopeus OECD-viljelyaineessa, kun valon voimakkuus on noin 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ja lämpötila 21 °C.

Suositeltujen koelajien viljelyä ja käsittelyä koskevat erityissuositukset

Pseudokirchneriella subcapitata ja Desmodesmus subspicatus

Näitä viherleviä on yleensä helppo ylläpitää erilaisissa viljelyaineissa. Kantakokoelmia pitävät laitokset antavat tietoja sopivista viljelyaineista. Solut ovat yleensä yksittäisinä soluina, ja solutiheys on helposti mitattavissa elektronisen hiukkaslaskimen tai mikroskoopin avulla.

Anabaena flos-aquae

Kantaviljelmää voidaan pitää erilaisissa viljelyaineissa. On erityisen tärkeää huolehtia siitä, että panoskasvatuksessa ei ohiteta kasvun viivevaihetta vaihdon yhteydessä, koska muuten palautuminen on vaikeaa.

Anabaena flos-aquae muodostaa solurihmoista vyyhtimäisiä kasaumia. Näiden kasaumien koko voi vaihdella viljelyolosuhteiden mukaan. Voi olla tarpeen rikkoa nämä kasaumat, jos biomassan määrityksessä käytetään mikroskooppilaskentaa tai elektronista hiukkaslaskinta.

Rihmojen pilkkomiseen voidaan käyttää osanäytteiden ultraäänihajotusta, millä voidaan vähentää laskentatulosten vaihtelevuutta. Solut voivat kuitenkin tuhoutua, jos ultraäänihajotusta jatketaan kauemmin kuin rihmojen pilkkominen lyhyemmiksi kappaleiksi edellyttää. Ultraäänihajotuksen voimakkuuden ja keston on oltava sama kaikissa käsittelyissä.

Hemosytometrilla lasketaan riittävän monta kenttää (vähintään 400 solua) vaihtelevuuden tasoittamiseksi. Tämä parantaa mikroskooppisten tiheysmääritysten luotettavuutta.

Kun solurihmat on pilkottu huolellisella ultraäänihajotuksella, Anabaena-solujen kokonaistilavuus voidaan määrittää elektronisella hiukkaslaskimella. Ultraäänihajotuksen energia on säädettävä siten, etteivät solut rikkoudu.

Käyttämällä Vortex-ravistelijaa tai muuta vastaavaa menetelmää varmistetaan, että leväsuspensio, jota käytetään koeastioiden siirostamiseen, on hyvin sekoitettu ja homogeeninen.

▼**M1**

Koeastiat on sijoitettava tasoravistelijaan, joka tekee edestakaista tai orbitaaliliikettä frekvenssillä 150 rpm. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää jaksoittaista ravistelua, joka vähentää Anabaenan taipumusta muodostaa rykelmiä. Jos rykelmiä kuitenkin muodostuu, on varmistettava, että biomassan mittauksia varten saadaan edustavia näytteitä. Ennen näytteiden ottoa voi olla tarpeen ravistella astioita voimakkaasti levärykelmien hajottamiseksi.

Synechococcus leopoliensis

Kantaviljelmää voidaan pitää erilaisissa viljelyaineissa. Kantakokoelmia pitävät laitokset antavat tietoja sopivista viljelyaineista.

Synechococcus leopoliensis kasvaa yksittäisinä sauvanmuotoisina soluina. Solut ovat hyvin pieniä, mikä vaikeuttaa mikroskooppilaskennan käyttöä biomassan mittauksissa. Elektroniset hiukkaslaskimet, joilla voidaan laskea jopa noin 1 µm:n suuruisia hiukkasia, ovat käyttökelpoisia. Lisäksi voidaan käyttää *in vitro* -fluoresenssimittauksia.

Navicula pelliculosa

Kantaviljelmää voidaan pitää erilaisissa viljelyaineissa. Kantakokoelmia pitävät laitokset antavat tietoja sopivista viljelyaineista. Viljelyaineissa on oltava silikaattia.

Navicula pelliculosa voi tietyissä kasvuolosuhteissa muodostaa kasaumia. Lipidituotannon vuoksi leväsolut pyrkivät joskus kerääntymään pintakalvoon. Siinä tapauksessa on ryhdyttävä erityistoimiin, jotta biomassan määritykseen saadaan edustavat osanäytteet. Voimakas ravistelu esimerkiksi Vortex-ravistimella voi olla tarpeen.

▼**M1**

Lisäys 2

Viljelyaine

Tässä testimenetelmässä voidaan käyttää jompaakumpaa seuraavista viljelyaineista:

OECD-viljelyaine: alkuperäinen OECD:n testiohjeen nro 201 mukainen viljelyaine, joka on myös ISO 8692 -standardin mukainen.

Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston (US EPA) viljelyaine AAP, joka on myös ASTM-standardin mukainen.

Näitä viljelyaineita valmistettaessa on käytettävä reagenssi- tai analyysilaatua olevia kemikaaleja ja deionisoitua vettä.

AAP-viljelyaineen (US EPA) ja OECD:n testiohjeen nro 201 mukaisen viljelyaineen koostumus

Komponentit	EPA		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) EDTA:n ja raudan moolisuhde on hieman suurempi kuin yksi. Näin estetään raudan saostumisen ja minimoidaan samalla raskasmetalli-ionien kelatoituminen.

Testissä, jossa käytetään *Navicula pelliculosa* -piilevää, molempiin viljelyaineisiin on lisättävä $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$:ta, kunnes Si-pitoisuudeksi saadaan 1,4 mg/l.

Viljelyaineen pH saadaan, kun viljelyaineen karbonaattijärjestelmä ja CO_2:n osapaine ilmassa ovat päässeet tasapainoon. Viljelyaineen pH:n ja molaarisen bikarbonaattipitoisuuden likimääräinen suhde 25 °C:ssa saadaan seuraavan kaavan avulla:

$$PH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

▼**M1**

Kun $NaHCO_3$ on 15 mg/l, pH_{eq} = 7,5 (US EPA -viljelyaine), ja kun $NaHCO_3$ on 50 mg/l, pH_{eq} = 8,1 (OECD-viljelyaine).

Testiviljelyaineen alkuainekoostumus

Alkuaine	EPA	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

OECD-viljelyaineen valmistus

Ravinne	Pitoisuus kantaliuoksessa
Kantaliuos 1: makroravinteet	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Kantaliuos 2: rauta	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
Kantaliuos 3: hivenaineet	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Kantaliuos 4: bikarbonaatti	
$NaHCO_3$	50 $g \cdot l^{-1}$
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Kantaliuokset steriloidaan kalvosuodatuksella (keskimääräinen huokoskoko 0,2 μm) tai autoklavoimalla (120 °C, 15 min). Liuoksia säilytetään pimeässä 4 °C:n lämpötilassa.

Kantaliuoksia 2 ja 4 ei saa autoklavoida, vaan ne on steriloitava kalvosuodatuksella.

▼M1

Viljelyaine valmistetaan lisäämällä veteen sopiva määrä kantaliuoksia 1–4:

Noin 500 ml:aan steriloitua vettä lisätään:

— 10 ml kantaliuosta 1

— 1 ml kantaliuosta 2

— 1 ml kantaliuosta 3

— 1 ml kantaliuosta 4.

Liuokseen lisätään steriloitua vettä, kunnes tilavuus on 1 000 ml.

Sen jälkeen on odotettava niin kauan kunnes viljelyaine ja ilman CO_2 ovat päässeet tasapainoon. Tarvittaessa liuokseen johdetaan tätä varten steriiliä suodatettua ilmaa muutaman tunnin ajan.

AAP-viljelyaineen valmistus

A1.1 Lisätään 1 ml kutakin kohdassa A1.2.1–A1.2.7 mainittua kantaliuosta noin 900 ml:aan deionisoitua tai tislattua vettä ja laimennetaan liuos 1 litraksi.

A1.2 Makroravinteita sisältävät kantaliuokset valmistetaan liuottamalla seuraavat aineet 500 ml:aan deionisoitua tai tislattua vettä. Reagenssit A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 ja A1.2.4 voidaan yhdistää yhdeksi kantaliuokseksi.

A1.2.1 $NaNO_3$–12,750 g

A1.2.2 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$–6,082 g

A1.2.3 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$–2,205 g

A1.2.4 *Mikroravinteita sisältävä kantaliuos* – (ks. A1.3)

A1.2.5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$–7,350 g

A1.2.6 K_2HPO_4–0,522 g

A1.2.7 $NaHCO_3$–7,500 g

A1.2.8 $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ – ks. huomautus A1.1.

HUOMAUTUS A1.1 – Käytetään vain piilevälajien viljelyssä. Voidaan lisätä suoraan (202,4 mg) tai kantaliuoksessa, jotta viljelyaineen lopulliseksi Si-pitoisuudeksi saadaan 20 mg/l.

A1.3 Makroravinteita sisältävä kantaliuos valmistetaan liuottamalla seuraavat aineet 500 ml:aan deionisoitua tai tislattua vettä.

A1.3.1 H_3BO_3–92,760 mg

A1.3.2 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$– 207,690 mg

A1.3.3 $ZnCl_2$–1,635 mg

A1.3.4 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$–79,880 mg

A1.3.5 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$–0,714 mg

A1.3.6 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$–3,630 mg

A1.3.7 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$–0,006 mg

A1.3.8 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$– 150,000 mg

[Dinatrium(eteenidinitrilo)tetra-asetaatti]

▼**M1**

A1.3.9 $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$–0,005 mg – ks. huomautus A1.2.

HUOMAUTUS A1.2 – Käytetään kantaviljelmien viljelyaineessa vain, kun viljellään piilevälajeja.

A1.4 Säädetään pH arvoon 7,5 ± 0,1 käyttämällä 0,1 *N* tai 1,0 *N* NaOH:a tai HCl:a.

A1.5 Viljelyaine suodatetaan steriiliin astiaan kalvosuodattimen läpi, jonka huokoskoko on 0,22 μm, jos käytetään hiukkaslaskinta. Jollei käytetä hiukkaslaskinta, huokoskoko on 0,45 μm.

A1.6 Viljelyainetta säilytetään käyttöön saakka pimeässä noin 4 °C:een lämpötilassa.

▼M1

Lisäys 3

Esimerkki levänviljelymenetelmästä

Yleisiä huomautuksia

Tässä kuvattavan menetelmän avulla voidaan viljellä leviä myrkyllisyyskokeita varten.

Sopivien menetelmien avulla on varmistettava, että leväviljelmissä ei ole bakteeritartuntaa. Aina on varmistettava, että viljelmissä esiintyy vain yhtä levälajia. Tämä pätee myös käytettäessä akseenisia viljelmiä.

Bakteerien tai muiden levien pääsy viljelmään on estettävä tekemällä kaikki toimet steriileissä olosuhteissa.

Välineet ja materiaalit

Ks. testimenetelmän kohta ”Välineet”.

Leväviljelmien tuottaminen

Ravintoliuosten (viljelyaineiden) valmistus:

Kaikki viljelyaineen ravintosuolat valmistetaan väkevänä kantaliuoksena, ja niitä säilytetään pimeässä ja viileässä. Liuokset steriloidaan suodattamalla tai autoklavoimalla.

Viljelyaine valmistetaan lisäämällä sopiva määrä kantaliuosta steriiliin tislattuun veteen. Samalla on huolehdittava siitä, ettei synny infektioita. Jos viljelyaine on kiinteää, lisätään 0,8 prosenttia agaria.

Kantaviljelmä:

Kantaviljelmät ovat pieniä leväviljelmiä, jotka siirretään säännöllisesti tuoreeseen viljelyaineeseen, jossa ne toimivat testin alkumateriaalina. Jos viljelmiä ei käytetä säännöllisesti, ne valutetaan kallistettuihin agarputkiin. Putket siirretään tuoreeseen viljelyaineeseen vähintään kahden kuukauden väliajoin.

Kantaviljelmiä viljellään sopivaa viljelyainetta sisältävissä erlenmeyerpulloissa (tilavuus noin 100 ml). Jos leviä inkuboidaan 20 °C:ssa jatkuvassa valaistuksessa, siirrot on tehtävä viikoittain.

Siirrossa ”vanhan” viljelmän osa siirretään steriilin pipetin avulla tuoretta viljelyainetta sisältävään pulloon. Jos laji on nopeasti kasvava, alkupitoisuuden on oltava noin sadasosa vanhan viljelmän pitoisuudesta.

Lajin kasvunopeus voidaan määrittää kasvukäyrän avulla. Näin on mahdollista arvioida, kuinka usein viljelmä on siirrettävä uuteen viljelyaineeseen. Siirto on tehtävä ennen kuin viljelmä kuolee.

Esiviljely:

Esiviljelyn avulla saadaan levämäärä, joka on sopiva testiviljelmien siirrostukseen. Esiviljelmää inkuboidaan testiolosuhteissa, ja viljelmä käytetään sen ollessa vielä eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa, yleensä 2–4 päivän pituisen inkubaation jälkeen. Leväviljelmät, jotka sisältävät epämuodostuneita tai poikkeavia soluja, on hylättävä.

▼M1

Lisäys 4

Tietojen analysointi epälineaarisen regression avulla

Yleisiä huomautuksia

Levätesteissä ja muissa testeissä, joissa mitataan mikro-organismien kasvua (biomassan kasvua), vastetta kuvaava muuttuja on luonnostaan jatkuva ja metrinen: prosessin nopeus, jos käytetään kasvunopeutta, ja sen integraali ajan funktiona, jos käytetään biomassaa. Molempia muuttujia verrataan toistoina tehtyjen altistumattomien kontrollien vastaavaan keskimääräiseen vasteeseen ottaen huomioon, että kontrollit reagoivat maksimaalisesti kulloisinkiin olosuhteisiin; levätestissä valo ja lämpötila ovat pääasialliset määräävät tekijät. Järjestelmä voi olla jakautunut tai homogeeninen, ja biomassaa voidaan pitää jatkumona ottamatta huomioon yksittäisiä soluja. Tämän järjestelmän vastetyypin varianssin jakautuminen riippuu ainoastaan testiolosuhteista (joille on luonteenomaista virheiden logaritmiset normaalijakaumat tai normaalijakaumat). Tämä poikkeaa tyypillisistä dikotomisista vasteista biologisissa testeissä, joissa oletetaan usein, että yksittäisten organismien toleranssi (jolle on tyypillistä binomijakauma) on hallitseva varianssikomponentti. Tällöin kontrollivasteet ovat nolla tai taustan tasoa.

Normalisoitu tai suhteellinen vaste r pienenee yksinkertaisessa tapauksessa tasaisesti 1:stä (ei kasvun estymistä) 0:aan (100-prosenttinen estyminen). On muistettava, että kaikkiin vasteisiin liittyy virhe ja että ilmeinen negatiivinen kasvun estyminen voi laskelmissa johtua pelkästään satunnaisvirheestä.

Regressioanalyysi

Mallit

Regressioanalyysin tavoitteena on kuvata pitoisuus-vastekäyrää matemaattisena regressiofunktiona $Y = f(C)$ tai yleisemmin $F(Z)$, jossa $Z = \log C$. Käänteisesti funktio $C = f^{-1}(Y)$ antaa mahdollisuuden laskea EC_x-arvot, kuten EC_{50}-, EC_{10}- ja EC_{20}-arvot, ja niiden 95 prosentin luottamusvälit. Useiden yksinkertaisten matemaattisten funktioiden on todettu soveltuvan pitoisuus–vaste-suhteen kuvaamiseen leväkasvun estymistesteissä. Niihin kuuluvat muun muassa logistinen kaava, epäsymmetrinen Weibull-jakauma ja logaritminen normaalijakauma, jotka ovat kaikki S-käyriä, jotka lähestyvät asymptoottisesti arvoa yksi, kun $C \rightarrow 0$, ja nollaa, kun $C \rightarrow$ ääretön.

Jatkuvan kynnysfunktion malleja (esimerkiksi Kooijmanin malli, joka kuvaa populaation kasvun estymistä, Kooijman et al., 1996) on hiljattain ehdotettu vaihtoehdoiksi asymptoottisille malleille. Tällaisissa malleissa oletetaan, että vaikutuksia ei esiinny tiettyä kynnysarvoa EC0+ pienemmillä pitoisuuksilla. Tämä pitoisuus arvioidaan ekstrapoloimalla vaste–pitoisuus-suhde siten, että se leikkaa pitoisuusakselin, käyttämällä yksinkertaista jatkuvaa funktiota, joka ei ole differentioituva lähtöpisteessä.

Analyysinä voi olla jäännösneliösummien yksinkertainen minimointi (kun varianssin oletetaan olevan vakio) tai painotettujen neliösummien yksinkertainen minimointi, jos varianssin heterogeenisuus kompensoidaan.

▼M1

Menettely

Menettely on seuraava: Valitaan sopiva funktionaaliyhtälö Y = f (C) ja sovitetaan se tietoihin epälineaarisella regressiolla. Tässä yhteydessä on parempi käyttää jokaisesta yksittäisestä pullosta tehtyjä mittauksia kuin toistojen keskiarvoja, jotta tiedoista saataisiin mahdollisimman paljon informaatiota. Toisaalta käytännön kokemus viittaa siihen, että jos varianssi on suuri, toistojen keskiarvoilla saadaan luotettavampi matemaattinen arviointi, johon tiedoissa esiintyvät satunnaisvirheet eivät vaikuta yhtä paljon kuin jos jokainen yksittäinen datapiste säilytettäisiin.

Sovitettu käyrä ja mitatut tiedot esitetään graafisesti, minkä jälkeen tutkitaan, onko käyrä sovitettu asianmukaisesti. Jäännösten analysointi voi olla erityisen käyttökelpoinen keino tähän tarkoitukseen. Jos pitoisuus–vaste-käyrän kuvaamiseen valittu funktionaalinen suhde ei kuvaa hyvin koko käyrää tai jotain sen olennaista osaa, kuten vastetta pienillä pitoisuuksilla, valitaan toisenlainen käyränsovitus, esimerkiksi Weibull-funktion kaltainen epäsymmetrinen käyrä symmetrisen käyrän sijasta. Negatiiviset inhibitiot voivat olla ongelmallisia muun muassa logaritmisen normaalijakauman yhteydessä ja voivat vaatia vaihtoehtoisen regressiofunktion käyttöä. Ei ole suositeltavaa merkitä näitä negatiivisia arvoja nollaksi tai antaa niille pientä positiivista arvoa, koska se vääristää virhejakaumaa. Voi olla aiheellista tehdä erilliset käyränsovitukset joillekin käyrän osille, esimerkiksi sille osalle, jossa kasvun estyminen on pientä, $EC_{pieni\ x}$-estimaattien määrittämiseksi. Sovitetusta yhtälöstä lasketaan (käänteisfunktiolla $C = f^{-1}(Y)$) EC_x:n luonteenomaiset piste-estimaatit, ja niistä ilmoitetaan ainakin EC_{50}-arvo ja yksi tai kaksi $EC_{pieni\ x}$-arvoa. Käytännön testauksesta saadut kokemukset ovat osoittaneet, että levätestillä saadaan yleensä kohtuullisen tarkka arviointi pitoisuuksilla, joilla kasvun estyminen on 10-prosenttista, jos datapisteitä on riittävästi ja pienillä pitoisuuksilla ei esiinny kasvun edistymistä häiritsevänä tekijänä. EC_{20}-estimaatin tarkkuus on yleensä huomattavasti parempi kuin EC_{10}-estimaatin, koska EC_{20} sijaitsee yleensä pitoisuus–vaste-käyrän keskiosan lähes lineaarisessa osassa. Joskus EC_{10}-arvoa voi olla vaikea tulkita kasvun edistymisen vuoksi. Sen vuoksi on suositeltavaa ilmoittaa aina myös EC_{20}-arvo, vaikka EC_{10}-arvo saadaankin yleensä riittävän tarkasti.

Painotuskertoimet

Testissä varianssi ei yleensä ole vakio, ja tavallisesti siihen sisältyy suhteellinen komponentti. Sen vuoksi on hyödyllistä tehdä painotettu regressio rutiininomaisesti. Tähän analyysin tarvittavien painotuskertoimien oletetaan yleensä olevan käänteisesti verrannollisia varianssiin:

$$W_i = 1/\mathrm{Var}(r_i)$$

Monet regressio-ohjelmat antavat mahdollisuuden tehdä painotettu regressioanalyysi painotuskertoimilla, jotka valitaan taulukosta. Painotuskertoimet voidaan helposti normalisoida kertomalla ne luvulla $n/\sum w_i$ (jossa n on datapisteiden määrä), jotta niiden summa olisi yksi.

Vasteiden normalisointi

Normalisointi kontrollien keskimääräisen vasteen avulla aiheuttaa joitakin periaatteellisia ongelmia ja johtaa melko mutkikkaaseen varianssirakenteeseen. Vastearvojen jakaminen kontrollien keskimääräisellä vastearvolla kasvunestymisprosentin määrittämiseksi aiheuttaa lisävirheen, joka johtuu kontrollien keskiarvoon liittyvästä virheestä. Jollei tämä virhe ole mitättömän pieni, regressioon sovellettavat painotuskertoimet ja luottamusvälit on korjattava ottaen huomioon kovarianssi kontrollin kanssa (17). On tärkeää, että kontrollien keskimääräinen vaste arvioidaan hyvin tarkasti, jotta voidaan minimoida suhteellisen vasteen kokonaisvarianssi. Varianssi saadaan seuraavasti:

▼M1

(Alaindeksi i tarkoittaa pitoisuutta i ja alaindeksi 0 tarkoittaa kontrolleja.)

$$Y_i = \text{suhteellinen vaste} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

kun varianssi on:

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i/\partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

ja koska

$$(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0 \text{ and } (\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$$

kun data on normaalisti jakautunut ja m_i ja m_0 ovat toistoja:

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

suhteellisen vasteen Y_i kokonaisvarianssi on:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\, m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\, m_0$$

Kontrollien keskiarvoon liittyvä virhe on kääntäen verrannollinen niiden kontrollitoistojen määrän neliöjuureen, joista keskiarvo on laskettu. Joskus voi olla aiheellista ottaa mukaan aiempia tietoja, jotta virhettä voidaan pienentää merkittävästi. Vaihtoehtoisena menetelmänä on, että tietoja ei normalisoida eikä absoluuttisia vasteita soviteta, kontrolleja koskevat vastetiedot mukaan luettuina, vaan kontrollivasteen arvo otetaan käyttöön lisäparametrina, joka sovitetaan epälineaarisella regressiolla. Käytettäessä tavanomaista kahden parametrin regressioyhtälöä, tämä menetelmä edellyttää kolmen parametrin sovittamista ja vaatii sen vuoksi enemmän datapisteitä kuin sellaisten tietojen epälineaarinen regressio, jotka on normalisoitu käyttämällä ennalta määritettyä kontrollivastetta.

Käänteiset luottamusvälit

On melko monimutkaista laskea epälineaarisen regression luottamusvälit estimoimalla käänteisfunktion avulla, eikä tätä vaihtoehtoa ole saatavilla tavanomaisissa tilasto-ohjelmistopaketeissa. Likimääräiset luottamusvälit voidaan saada tavanomaisilla ohjelmilla, joita käytetään epälineaarisen regression laskemiseen, käyttämällä uudelleenparametrisointia (Bruce ja Versteeg, 1992), jolloin matemaattinen kaava kirjoitetaan uudelleen käyttämällä haluttuja piste-estimaatteja, esimerkiksi EC_{10}- ja EC_{50}-arvoa, arvioitavina parametreina. (Funktioksi valitaan $I = f(\alpha, \beta, \text{pitoisuus})$ ja käytetään määritelmäsuhteita $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0{,}1$ ja $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0{,}5$ korvaamaan $f(\alpha, \beta, \text{pitoisuus})$ vastaavalla funktiolla $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{pitoisuus})$.)

Laskenta voidaan tehdä suoraan (Andersen et al, 1998) säilyttämällä alkuperäinen yhtälö ja käyttämällä Taylorin laajennusta r_i:n ja r_0:n keskiarvojen ympäristössä.

Viimeaikoina on käytetty yhä enemmän ”bootstrap”-menetelmiä. Näissä menetelmissä arvioidaan empiiristä variansijakaumaa käyttämällä mitattuja tietoja ja tiheää uusintanäytteiden ottoa, jota ohjataan satunnaislukugeneraattorilla.

Kirjallisuus

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research, 30, 1625–1632.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem.11, 1485–1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics, 3, 405–420.

▼B

C.4 BIOHAJOAVUUDEN MÄÄRITYS

OSA I YLEISTÄ

I.1 JOHDANTO

Jäljempänä kuvataan kuusi menetelmää, joiden avulla voidaan tutkia kemikaalin biohajoavuutta aerobisessa vesiliuoksessa. Menetelmät ovat seuraavat:

a) Liukoinen orgaaninen hiili (DOC — Dissolved Organic Carbon) Die-Away -menetelmä C.4-A,

b) Muunneltu OECD-seulonta (DOC Die-Away) -menetelmä C.4-B,

c) Hiilidioksidin (CO_2) muodostus (muunneltu Sturm-testi) — menetelmä C.4-C

d) Manometrinen respirometria -menetelmä C.4-D

e) Suljettu pullo -menetelmä C.4-E

f) MITI (Ministry of International Trade and Industry, Japani) -menetelmä C.4-E

Menetelmäkuvausten osassa I on kunkin testin yleiskuvaus. Osissa II–VII on kuvattu menetelmän erityispiirteet. Liitteissä on määritelmiä, suureyhtälöitä ja ohjeita.

OECD-maiden laboratorioiden välinen, vuonna 1988 suoritettu testi osoitti, että menetelmillä saadut tulokset ovat yhtenäiset. Menetelmää valittaessa on kuitenkin otettava huomioon testattavan aineen fysikaaliset ominaisuudet.

I.2 MENETELMÄN VALINTA

Sopivimman menetelmän löytämiseksi on hankittava tietoja aineen kemiallisesta liukoisuudesta, höyrynpaineesta ja adsorptio-ominaisuuksista. Aineen kemiallinen rakenne tai kaava on selvitettävä teoreettisten arvojen laskentaa tai mitattujen parametrien — esimerkiksi ThOD:n, $ThCO_2$:n, DOC:n, TOC:n ja COD:n — tarkistamista varten (katso liitteitä I ja II).

Kemikaaleja, joiden vesiliukoisuus on vähintään 100 mg/l, voidaan tutkia kaikilla menetelmillä, edellyttäen, etteivät kemikaalit ole haihtuvia tai adsorboivia. Huonosti veteen liukenevia, haihtuvia tai adsorboivia kemikaaleja varten soveltuvat menetelmät luetellaan taulukossa 1. Esimerkkejä huonosti veteen liukenevien ja haihtuvien kemikaalien käsittelymahdollisuuksista kuvataan liitteessä III. Lievästi haihtuvia kemikaaleja voidaan testata DOC Die-Away -menetelmällä, edellyttäen että testausastiassa on riittävä kaasutila (astian on oltava suljettua tyyppiä). Tällöin on tehtävä abioottisia tarkistuksia mahdollista fysikaalista hukkaa ajatellen.

▼B

Taulukko 1

Testimenetelmien soveltuvuus

Testi	Analyyttinen menetelmä	Soveltuvuus		
		huonosti liukenevat aineet	haihtuvat aineet	adsorboivat aineet
DOC Die-Away	Liuennut orgaaninen hiili	—	—	+/-
Muunneltu OECD Die-Away	Liuennut orgaaninen hiili	—	—	+/-
CO_2:n muodostus	Respirometria: CO_2:n muodostus	+	—	+
Manometrinen respirometria	Manometrinen respirometria: hapenkulutus	+	+/-	+
Suljettu pullo	Respirometria: liuennut happi	+/-	+	+
MITI	Respirometria: hapenkulutus	+	+/-	+

Tulosten tulkintaa varten tarvitaan tietoja testattavan aineen pääosien puhtaudesta tai niiden suhteellisista osuuksista, etenkin jos tuloksena saatavat arvot ovat pieniä tai marginaalisia.

Sopivan testauspitoisuuden löytämiseksi on suositeltavaa selvittää aineen myrkyllisyys bakteereille (liite IV). Näiden tietojen avulla voidaan usein varmistaa oikea tulkinta, jos tuloksena saatu biohajoavuus on heikko.

I.3 VERTAILUAINEET

Menetelmän tarkistamiseksi biohajoavuuskriteerin täyttäviä vertailukemikaaleja testataan rinnan testiajojen kanssa tarkoitukseen sopivassa pullossa.

Sopivia vertailukemikaaleja ovat (vastatislattu) aniliini, natriumasetaatti ja natriumbentsoaatti, jotka kaikki hajoavat näiden menetelmien mukaan käsiteltynä, myös ilman siirrosaineen lisäystä.

On ehdotettu sellaisen vertailukemikaalin etsimistä, jolla olisi hyvä biohajoavuus, mutta joka edellyttäisi siirrosaineen lisäystä. Tarkoitukseen on ehdotettu kaliumvetyftalaattia, josta on kuitenkin saatava lisätodisteita, ennen kuin se voidaan hyväksyä vertailuaineeksi.

Respirometrisissä testeissä typpeä sisältävät yhdisteet voivat häiritä hapenottoa nitrifikaation vuoksi (katso liitteitä II ja V).

I.4 TESTIMENETELMIEN PERIAATE

Testattavaa ainetta, joka on liuotettu tai suspendoitu epäorgaaniseen aineeseen, siirrostetaan ja inkuboidaan aerobisissa olosuhteissa pimeässä tai heikossa valaistuksessa. Testiliuoksen siirrostuksesta saadun DOC-määrän on oltava mahdollisimman pieni testattavasta aineesta saatuun DOC-määrään verrattuna. Siirrosaineen endogeeninen aktiviteetti otetaan huomioon ajamalla rinnan taustakokeita käyttäen pelkää siirrosainetta ilman testattavaa ainetta, vaikka solujen endogeeninen aktiviteetti testattavan aineen vaikutusten vuoksi ei ole täysin sama kontrolliliuoksessa ja testiliuoksessa. Menetelmien tarkistamiseksi ajetaan rinnakkaiskoe vertailuainetta käyttäen.

▼B

Hajoamisvaiheen jälkeen seuraa yleensä parametrien (esimerkiksi DOC:n, CO_2-tuotannon ja hapenoton) määritys. Biohajoavuusvaiheen alku ja loppu voidaan todeta tekemällä mittauksia riittävän usein. Jos käytetään automaattisia respirometrejä, mittaaminen on jatkuvaa. DOC-arvo mitataan eräissä tapauksissa toisen parametrin mittauksen yhteydessä, mutta tavallisimmin DOC-mittaus tehdään kokeen alussa ja lopussa. Spesifisen kemiallisen analyysin avulla voidaan määrittää myös testattavan aineen primaarinen hajoaminen ja mahdollisesti muodostuvat välituotteet (pakollinen osa MITI-testiä).

Kokeen kesto on yleensä 28 päivää. Koe voidaan keskeyttää aiemmin, jos biohajoavuuskäyrässä on vähintään kolmen mittauksen pituinen tasanne. Koetta voidaan myös jatkaa 28. päivän jälkeen, jos biohajoavuuskäyrästä nähdään, että biohajoamisvaihe on alkanut, mutta ei vielä ole saavuttanut tasannetta 28. päivän kohdalla.

I.5 LAATUKRITEERIT

I.5.1 **Toistettavuus**

Biohajoavuuden ominaisuuksien ja siirrosaineksena käytettyjen yhdistettyjen bakteeriviljelmien ominaisuuksien vuoksi määritykset on tehtävä vähintään kaksi kertaa.

Käytäntö on osoittanut, että mitä suurempi on kokeen alussa testiliuokseen lisättyjen pieneliöiden pitoisuus, sitä vähäisempi on toistojen välinen vaihtelu. Rengastesteillä on voitu osoittaa, että eri laboratorioista saadut tulokset voivat vaihdella merkittävästi. Niiden aineiden osalta, joiden biohajoavuus on hyvä, on kuitenkin yleensä saatu varsin yhteneviä tuloksia.

I.5.2 **Kokeen hyväksyminen**

Koe hyväksytään, jos kemikaalin hajoamisarvojen ero biohajoavuuskäyrän tasanteen kohdalla (testin alussa tai 10-päiväisen jakson lopussa) toistojen ääriarvojen osalta on enintään 20 % ja jos vertailuaineen prosentuaalinen hajoaminen on saavuttanut hyvän biohajoavuuden tason 14 päivän kuluessa. Jos jompikumpi näistä ehdoista ei täyty, koe on toistettava. Koska menetelmien valinnanvara on vähäinen, pienet arvot eivät välttämättä tarkoita sitä, ettei aineen biohajoavuus luonnonympäristössä voisi olla hyvä. Pienet arvot osoittavat kuitenkin, että aineen biohajoavuuden määrittämiseksi tarvitaan lisätutkimuksia.

Jos myrkyllisyystestissä, jossa käytetään sekä testattavaa ainetta että vertailukemikaalia, saadaan tulokseksi hajoaminen, joka 14 päivän kuluessa on DOC-pohjaisena enintään 35 % tai THOD- tai $ThCO_2$-pohjaisena enintään 25 %, voidaan olettaa, että testattavalla kemikaalilla on inhibitonsia ominaisuuksia (katso myös liitettä IV). Tällöin koesarja on toistettava, mahdollisesti pienempää kemikaalin pitoisuutta tai suurempaa siirrosaineen pitoisuutta käyttäen, ei kuitenkaan yli 30 mg:aa kuiva-ainetta litraa kohti.

I.6 YLEISIÄ MENETELMIÄ JA VALMISTELUJA

Taulukossa 2 on yhteenveto testiin sovellettavista yleisistä olosuhteista. Yksittäisten kokeiden laitteet ja olosuhteet kuvataan tarkemmin kokeiden omissa menetelmäkuvauksissa.

▼B

Taulukko 2

Testiolosuhteet

Koe	DOC Die-Away	CO_2-muodostus	Manometrinen respirometria	Muunneltu OECD-seulonta	Suljettu pullo	MITI (I)
Testattavan aineen pitoisuus						
mg/l			100		2–10	100
mg DOC/l	10–40	10–20	10–40			
mg ThOD/1			50–100		5–10	
Siirrosaineen pitoisuus (soluja/l, likiarvo)	≤ 30 mg/l SS tai ≤ 100 ml jätevettä/l (10^7 – 10^8)			0,5 ml sekundaarista jätevettä/l (10^5)	≤ 5 ml jätevettä/l (10^4-10^6)	30 mg/l SS (10^7-10^8)
Epäorgaanisen liuoksen koostumus (mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 - 0,1				0,05 - 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					suositus: 7,0
Lämpötila	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = Liuennut orgaaninen hiili ThOD = Teoreettinen hapentarve SS = Suspendoitunut kuiva-aine

I.6.1 **Laimennusvesi**

Laimennukseen käytetään ionivaihdettua tai tislattua vettä, jossa ei ole inhibitoorisia pitoisuuksia myrkyllisiä aineita (esimerkiksi Cu^{++}-ioneja). Vedessä saa olla enintään 10 % testattavasta materiaalista saatua orgaanista hiiltä. Erittäin puhtaan veden käyttö on oleellista suurten tausta-arvojen välttämiseksi. Veteen voi tulla saasteita luontaisista epäpuhtauksista, ioninvaihtohartseista tai bakteereista ja levistä liuenneista aineista. Koesarjoittain on käytettävä samaa vesierää, jolle on ensin tehtävä DOC-analyysi. Suljetun pullon koetta varten tätä tarkistusta ei tarvita, mutta veden hapenkulutuksen on oltava pieni.

▼B

I.6.2 **Epäorgaanisten ainesosien kantaliuos**

Testiliuokset valmistetaan epäorgaanisia aineita sisältävistä kantaliuoksista. Jäljempänä luetellut kantaliuokset soveltuvat (sopivasti laimennettuina) seuraaviin menetelmiin: DOC Die-Away, muunneltu OECD-seulonta, CO_2-muodostus, manometrinen respirometria, suljetun pullon koe.

Laimennuskertoimet ja MITI-kokeen epäorgaanisen liuoksen spesifinen valmistelutapa mainitaan kunkin kokeen otsikon alla.

Kantaliuokset:

Valmistetaan seuraavat kantaliuokset analyyttisen puhtaita reagensseja käyttäen:

a)	Kaliumdivetyortofosfaattia, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliummonovetyortofosfaattia, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriummonovetyortofosfaattidihydraattia, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	33,40 g
	Ammoniumkloridia, NH_4CI	0,50 g
	Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen. Liuoksen pH-arvon on oltava 7,4.	
b)	Kalsiumkloridia, $CaCl_2$	27,50 g
	tai kalsiumkloridididihydraattia, $CaCl_2 \times 2H_2O$	36,40 g
	Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.	
c)	Magnesiumsulfaattiheptahydraattia, $MgSO_4 \times 7H_2O$	22,50 g
	Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.	
d)	Rauta(III)kloridi-heksahydraattia, $FeCl_3 \times 6H_2O$	0,25 g
	Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.	

Huomautus: Jotta liuosta ei tarvitsisi valmistaa välittömästi ennen käyttöä, siihen voidaan lisätä tippa väkevää suolahappoa tai 0,4 g EDTA:ta litraa kohti.

I.6.3 **Kemikaaleista valmistetut kantaliuokset**

Jos aineen liukoisuus on yli 1 g/1, 1–10 g testattavaa tai kontrollina käytettävää kemikaalia liuotetaan ionivaihdettuun veteen ja liuos laimennetaan yhden litran tilavuuteen. Muussa tapauksessa kantaliuos voidaan valmistaa epäorgaaniseen liuokseen tai kemikaalia voidaan lisätä suoraan epäorgaaniseen liuokseen. Huonosti liukenevien kemikaalien käsittely kuvataan liitteessä ITL MITI-kokeessa (menetelmä C.4-F) ei saa käyttää liuottimia tai emulgaattoreita.

▼B

I.6.4 **Siirrosaine**

Siirrosaine voi olla peräisin useasta lähteestä: aktivoidusta lietteestä, jätevedestä (ilman kloorikäsittelyä), pintavedestä, maa-aineksesta tai näiden seoksesta. Jos DOC Die-Away-, CO_2-muodostus- ja manometrinen respirometria -kokeissa käytetään aktiivilietettä, se on otettava käsittelylaitoksesta tai laboratoriolaitoksesta, johon syötetään pääosin kotitalouksista tulevaa jätevettä. Muista lähteistä otetun siirrosaineen on todettu aiheuttavan varsin epäyhtenäisiä tuloksia. Muunneltua OECD-seulontamenetelmää ja suljetun pullon menetelmää varten tarvitaan matalapitoista siirrosainetta ilman lieteflokkeja. Tällöin suositellaan talousveden esikäsittelylaitoksesta tai laboratoriolaitokscsta saatua sekundaarista jätevettä. MITI-menetelmää varten tarvittava siirrosaine saadaan sekoittamalla eri lähteistä saatuja aineita (tarkempi kuvaus löytyy MITI-menetelmän otsikon alta).

I.6.4.1 *Siirrosaine aktiivilietteestä*

Aktiivilietenäyte otetaan sellaisenaan pääosin kotitalouksien jätevettä käsittelevän vedenpuhdistamon tai laboratoriolaitoksen ilmastussäiliöstä. Tarvittaessa karkeat hiukkaset poistetaan suodattamalla hienon seulan läpi, minkä jälkeen liete pidetään aerobisena.

Lietteen annetaan asettua tai se sentrifugoidaan (esimerkiksi 1 100 g 10 minuutin ajan) karkeiden hiukkasten poiston jälkeen. Pintaliete hylätään. Lietettä voidaan pestä epäorgaanisessa liuoksessa. Väkevöity liete suspendoidaan epäorgaaniseen liuokseen (lopullinen pitoisuus 3–5 g kuiva-ainetta/l) ja säilötään ilmastettuna.

Lietteen on tultava tehokkaasti toimivasta, perinteisen tekniikan mukaisesta laitoksesta. Jos liete on otettava suurkuormituslaitoksesta tai jos epäillään lietteen sisältävän inhibiittoreita, liete on pestävä. Liete sekoitetaan hyvin, minkä jälkeen uudelleen suspendoitunut liete saa asettua tai se sentrifugoidaan. Pintaliete hylätään ja pesty liete suspendoidaan uudelleen uuteen epäorgaaniseen liuokseen. Menettelyä toistetaan, kunnes voidaan katsoa, ettei lietteessä ole enää ylimääräistä substraattia tai inhibiittoria.

Kun liete on täysin uudelleensuspendoitunut (tai jos lietettä käytetään sellaisenaan), näyte kerätään välittömästi ennen käyttöä. Suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus määritetään näytteestä.

Yksi vaihtoehto on lisäksi aktiivilietteen homogenointi (3–5 g suspendoitunutta kuiva-ainetta/l). Lietettä käsitellään mekaanisessa sekoittimessa keskinopeudella 2 minuutin ajan. Sekoitetun lietteen annetaan asettua 30 minuutin ajan (tai tarvittaessa kauemmin), ja neste dekantoidaan. Näin saatua nestettä käytetään siirrosaineena (pitoisuus: 10 ml/l epäorgaanista liuosta).

I.6.4.2 *Muita siirrosainelähteitä*

Siirrosainetta voidaan valmistaa myös pääosin kotitalouksien jätevettä käsittelevän laitoksen tai laboratoriolaitoksen sekundaarisesta jätevedestä. Kerätään tuore näyte, joka pidetään aerobisena kuljetuksen ajan. Näytteen annetaan asettua tunnin ajan tai se suodatetaan karkean suodatinpaperin läpi. Näin saatua dekantoitua jätevettä tai suodosta säilytetään aerobisena, kunnes sitä tarvitaan. Tämäntyyppistä siirrosainetta voidaan käyttää enintään 100 ml liuoslitraa kohti.

▼B

Siirrosainetta voidaan ottaa myös pintavedestä. Esimerkiksi joen tai järven pintavedestä otetaan näyte, jota säilytetään aerobisena, kunnes sitä tarvitaan. Tarvittaessa siirrosaine voidaan väkevöidä suodattamalla tai sentrifugoimalla.

I.6.5 **Siirrosaineen esikäsittely**

Esikäsittelyn avulla siirrosaine voidaan sopeuttaa testiolosuhteisiin, mutta ei testattavaan kemikaaliin. Esikäsittelyssä aktiivilietettä ilmastetaan epäorgaanisessa liuoksessa tai sekundaarisessa jätevedessä 5–7 päivän ajan testilämpötilassa. Esikäsittelyn avulla on mahdollista saada tarkempia tuloksia, koska tausta-arvot jäävät pois. MITI-menetelmän avulla valmistettua siirrosainetta ei tarvitse esikäsitellä.

I.6.6 **Abioottiset tarkistukset**

Tarvittaessa testattavan aineen mahdollinen abioottinen hajoaminen on tarkistettava määrittämällä DOC:n poistuma, hapenotto tai hiilidioksidinmuodostus steriilistä vertailunäytteestä, jossa ei ole siirrosainetta. Sterilointi tehdään kalvosuodatuksella (0,2–0,45 μm) tai lisäämällä sopiva määrä soveltuvaa myrkyllistä ainetta. Jos käytetään kalvosuodatusta, näytteet on otettava aseptisesti steriiliyden varmistamiseksi. Ellei testattavan kemikaalin adsorptiomahdollisuutta ole voitu sulkea pois, testeihin, joissa mitataan biohajoamista DOC:n poistuman avulla (etenkin käytettäessä aktiivilietettä siirrosaineena), on sisällytettävä abioottinen (siirrostettu ja myrkytetty) vertailunäyte.

I.6.7 **Pullojen määrä**

Tyypillisessä kokeessa käytettävä pullomäärä mainitaan kunkin kokeen otsikon alla.

Seuraavia pullotyyppejä voidaan käyttää:

— Testisuspensio: pullossa testattavaa ainetta ja siirrosainetta

— Siirrosaineen taustanäyte: pullossa pelkkää siirrosainetta

— Menetelmän vertailunäyte: pullossa vertailu- ja siirrosainetta

— Steriili abioottinen vertailunäyte: steriili pullo, jossa on testattavaa ainetta

— Adsorptiotarkistus: pullossa testattavaa ainetta, siirrosainetta ja steriloivaa ainetta

— Myrkyllisyyskoe: pullossa testattavaa ainetta, vertailuainetta ja siirrosainetta.

Testisuspension ja siirrosaineen taustanäytteen määritykset on ehdottomasti tehtävä rinnan. On suositeltavaa tehdä myös muiden pullojen määritykset rinnan.

Tämä ei ehkä aina ole mahdollista. On tärkeää, että otetaan riittävä määrä näytteitä tai lukemia, jotta 10-päiväisen jakson aikana syntyvä prosentuaalinen poistuma voidaan määrittää.

▼B

I.7 TIEDOT JA ARVIOINTI

D_t-arvon laskennassa käytetään prosentuaalista hajoamista, parametrin kaksoismittausten keskiarvoja molempien testisäiliöiden osalta ja siirrosaineen taustanäytettä. Laskentaan käytettävät suureyhtälöt mainitaan jäljempänä kunkin kokeen yhteydessä. Hajoaminen esitetään graafisessa muodossa (10-päiväinen jakso merkitään). Lasketaan ja raportoidaan saavutettu prosentuaalinen poistuma 10-päiväisen jakson lopussa samoin kuin käyrän tasanteen arvo tai arvo kokeen päätyttyä (valitaan sopivampi arvo).

Respirometrisissä testeissä typpeä sisältävät yhdisteet voivat häiritä hapenottoa nitrifikaation vuoksi (katso liitteitä II jaV).

I.7.1 **DOC-määrityksen avulla mitattu hajoaminen**

Lasketaan jokaisen näytteenoton ajankohdan prosentuaalisen hajonnan arvo D_t kutakin testattavaa ainetta kohti DOC-kaksoismittausten keskiarvoja käyttäen (kaksoismittausten avulla voidaan vahvistaa kokeen hyväksyttävyys — katso kohtaa 1,5.2). D_t-arvo lasketaan seuraavan suureyhtälön avulla:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

jossa

D_t = prosentuaalinen hajoaminen ajankohtana t,

C_o = siirrostetun, testiainetta sisältävän viljelmän keskimääräinen DOC-pitoisuus kokeen alussa (mg DOC/l),

C_t = siirrostetun, testiainetta sisältävän viljelmän keskimääräinen DOC-pitoisuus hetkellä t (mg DOC/l),

C_{bo} = siirrostetun, taustanäytteenä käytettävän epäorgaanisen liuoksen keskimääräinen DOC-pitoisuus kokeen alussa (mg DOC/l)

C_{bt} = siirrostetun, taustanäytteenä käytettävän epäorgaanisen liuoksen keskimääräinen DOC-pitoisuus hetkellä t (mg DOC/l).

Kaikki pitoisuudet mitataan kokeellisesti.

I.7.2 **Spesifisen analyysin avulla mitattava hajoaminen**

Jos käytettävissä on spesifisiä analyyttisiä tietoja primaarinen biohajoaminen voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

jossa:

D_t = prosentuaalinen hajonta hetkellä t (yleensä 28 päivää)

S_a = testattavan aineen jäännösmäärä (mg) siirrostetussa liuoksessa kokeen lopussa

S_b = testattavan aineen jäännösmäärä (mg) taustanäytteessä (vettä/-liuosta, johon on lisätty vain testattavaa ainetta)

▼B

I.7.3 **Abioottinen hajoaminen**

Jos käytetään abioottista, steriiliä vertailunäytettä, prosentuaalinen abioottinen hajoaminen voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$\text{prosentuaalinen abioottinen hajoaminen} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

jossa

$C_{s(o)}$ = steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus päivänä 0 (kokeen alussa)

$C_{s(t)}$ = steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus päivänä t

I.8 RAPORTOINTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— testattavat aineet ja vertailuaineet sekä niiden puhtausluokka,

— testiolosuhteet,

— siirrosaineen laatu ja ottopaikka (-paikat), pitoisuus ja mahdolliset esikäsittelyt,

— jäteveden teollisuusjätteiden osuus ja laatu (jos tunnetaan),

— kokeen kesto ja lämpötila,

— mahdollisten huonosti liukenevien käsittely,

— käytetty testimenetelmä; kaikista muutoksista on annettava tieteelliset perustelut ja selvitykset,

— tietolomake,

— mahdollisesti havaitut inhibiitioilmiöt,

— mahdollisesti havaittu abioottinen hajoaminen,

— spesifiset kemialliset analyysitiedot (jos käytettävissä),

— välituotteiden analyyttiset tiedot (jos käytettävissä),

— käyrät, jotka esittävät testattavan aineen ja vertailuaineiden prosentuaalisen hajoamisen ajan funktiona; lepovaihe, hajoamisvaihe, 10-päiväinen jakso ja kaltevuus on merkittävä selvästi (liite I). Jos testi täyttää testikriteent, käyrässä voidaan käyttää testattavan aineen prosentuaalisen hajoamisen keskiarvoa,

— prosentuaalinen poistuma 10-päiväisen jakson jälkeen ja käyrän tasanteella tai kokeen lopussa.

OSA II. **DOC DIE-AWAY-KOE** (menetelmä C.4-A)

II. 1 MENETELMÄN PERIAATE

Mitattu tilavuus siirrostettua epäorgaanista liuosta, jossa on tunnettu pitoisuus testattavaa ainetta (10–40 mg DOC/l) ainoana nimellisenä hiililähteenä, ilmastetaan heikossa valossa tai pimeässä pitäen yllä lämpötilaa 22 ± 2 °C.

▼B

Hajoamista seurataan usein tehtävien DOC-analyysien avulla 28 päivän jakson aikana. Hajoamisaste lasketaan ilmaisemalla poistuneen DOC:n (siirrostetun taustanäytteen arvolla korjattuna) prosenttiosuus alkupitoisuudesta. Primaarisen biohajoamisen aste voidaan laskea myös inkubaation alussa ja lopussa tehdyn kemiallisen analyysin avulla.

II.2 MENETELMÄKUVAUS

II.2.1 **Laite**

a) erlenmeyerpulloja (tilavuudeltaan esimerkiksi 250 ml–2 1) DOC-analyysin edellyttämän tilavuuden mukaan,

b) ravistuskone pulloja varten (koneessa on oltava automaattinen lämpötilan säätö tai sitä on käytettävä lämpötilasäädetyssä huoneessa, ja sen on pystyttävä ylläpitämään aerobisia olosuhteita kaikissa pulloissa),

c) sopivin kalvoin varustettu suodatuslaite,

d) DOC-analysaattori,

e) liuenneen hapen määrityslaite,

f) sentrifugi.

II.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

10 ml a-liuosta sekoitetaan 800 ml:aan laimennusvettä, lisätään b-, c- ja d-liuosta 1 ml kutakin ja laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

II.2.3 **Siirrosaineen valmistelu ja esikäsittely**

Siirrosaineen lähteinä voidaan käyttää aktiivilietettä, jätevettä, pintavettä, maata tai näiden sekoitusta.

Katso kohtia I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

II.2.4 **Pullojen valmistelu**

Pannaan epäorgaanista liuosta 2 litran erlenmeyerpulloihin esimerkiksi 800 ml:n annoksina. Riittävä määrä testattavan aineen ja vertailuaineen kantaliuosta lisätään eri pulloihin siten, että saadaan kemikaalipitoisuus, joka vastaa pitoisuutta 10–40 ml DOC/l. Tarkistetaan pH ja säädetään se tarvittaessa arvoon 7,4. Pullot siirrostetaan aktiivilietteellä tai muulla siirrosaineella (katso kohtaa I.6.4) siten, että lopullinen pitoisuus on enintään 30 mg suspendoitunutta kuiva-ainetta/l. Valmistetaan myös siirrosaineen vertailunäytteet epäorgaaniseen liuokseen, mutta ilman testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia.

Tarvittaessa testattavan kemikaalin mahdolliset inhibitooriset ominaisuudet on tarkistettava siirrostamalla yhteen pulloista epäorgaanista liuosta, jossa on vertailukelpoiset pitoisuudet testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia.

Tarvittaessa valmistetaan myös erillinen steriili pullo, jonka avulla tarkistetaan testattavan kemikaalin abioottinen hajoaminen käyttäen kemikaalin liuosta, johon ei ole lisätty siirrosainetta (katso kohtaa I.6.6).

▼B

Jos epäillään, että testattava kemikaali adsorboituu merkittävissä määrin esimerkiksi lasiin tai lietteeseen, voidaan tehdä alustava kemikaalin adsorption todennäköisen laajuuden määritys, jonka perusteella voidaan arvioida testimenetelmän soveltuvuutta tälle kemikaalille (katso taulukkoa 1). Alustavaa määritystä varten pulloon lisätään testattavaa ainetta, siirrosainetta ja sterilointiainetta.

Kaikkien pullojen sisältö laimennetaan epäorgaanisella liuoksella yhden litran tilavuuteen. Sekoituksen jälkeen jokaisesta pullosta otetaan näyte alkuperäisen DOC-pitoisuuden määritystä varten (katso liitettä II.4). Pullojen suut peitetään esimerkiksi alumiinifoliolla siten, että ilma pääsee vapaasti vaihtumaan pullon ja ympäristön välillä. Tämän jälkeen pullot pannaan ravistuskoneeseen kokeen aloittamista varten.

II.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Pullot 1 ja 2: Testisuspensio

Pullot 3 ja 4: Siirrosaineen taustanäyte

Pullo 5: Menetelmän vertailunäyte

Seuraavia pulloja on käytettävä tarpeen mukaan, ja niiden käyttö on muutenkin suositeltavaa:

Pullo 6: Steriili abioottinen vertailunäyte

Pullo 7: Adsorption vertailunäyte

Pullo 8: Myrkyllisyystarkistus

Katso myös kohtaa I.6.7.

II.2.6 **Testin suorittaminen**

Testin aikana kunkin pullon DOC-pitoisuus määritetään kahdesti tietyin välein. Määritykset on tehtävä riittävän usein, jotta voidaan määrittää 10-päiväisen jakson alku ja prosentuaalinen poistuma tämän jakson lopussa. Määrityksiä varten otetaan pienin mahdollinen määrä testisuspensiota.

Ennen näytteenottoa pulloista haihtunut vesimäärä on kompensoitava lisäämällä pulloihin tarpeellinen määrä laimennusvettä (I.6.1). Pullojen sisältö sekoitetaan huolellisesti varmistaen, että pullojen seinämiin kiinnittynyt aines liukenee tai suspendoituu ennen näytteenottoa. Näytteet kalvosuodatetaan tai sentnfugoidaan heti näytteenoton jälkeen (katso liitettä II.4). Ellei näytteitä analysoida samana päivänä, niitä voidaan säilyttää 2–4 °C:ssa enintään 48 tuntia tai alle –18 °C:ssa, jos ne joutuvat odottamaan tätä pitempään.

II.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

II.3.1 **Tulosten käsittely**

Annetun hetken t prosentuaalinen hajoaminen lasketaan kohdan I.7.1 mukaan (DOC-määritys) ja vaihtoehtoisesti kohdan I.7.2 mukaan (spesifinen analyysi).

Tulokset kirjataan jäljempänä kuvattavaan tietolomakkeeseen.

▼B

II.3.2 **Tulosten hyväksyttävyys**

Katso kohtaa I.5.2.

II.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

II.4 TIETOLOMAKE

Ohessa on esimerkki tietolomakkeesta.

DOC DIE-AWAY -KOE

1 **LABORATORIO**

2 **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

3 **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l kemikaalina

Liuoksen alkupitoisuus, t_o: mg/l kemikaalina

4 **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittely (jos esikäsittely on tehty):

Reaktioseoksen pitoisuus suspendoitunutta kuiva-ainetta: mg/l

5 **HIILIMÄÄRITYKSET**

Hiilianalysaattori:

	Pullon numero		DOC-arvo n päivän jälkeen (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testattavaa kemikaalia ja siirrosainetta	1	a_1					
		a_2					
		a:n keskiarvo $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b:n keskiarvo $C_{b(t)}$					

▼B

	Pullon numero		DOC-arvo n päivän jälkeen (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Siirrosaineen taustanäyte ilman testattavaa kemikaalia	3	c_1					
		c_2					
		c:n keskiarvo $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d:n keskiarvo $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **LÄHDETIETOJEN ARVIOINTI**

Pullon numero		Prosentuaalinen hajoaminen n päivän jälkeen				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Keskiarvo - (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Jos D_1- ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

7. **ABIOOTTINEN TARKISTUS** (valinnainen)

	Aika (päivää)	
	0	t
Steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus (mg/l)	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{Prosentuaalinenabioottinenhajoavuus} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPESIFINEN KEMIALLINEN ANALYYSI** (valinnainen)

	Testattavan kemikaalin jäännösmäärä kokeen lopussa (mg/l)	Prosentuaalinen primaarinen hajoaminen
Steriili vertailunäyte	s_b	

▼B

	Testattavan kemikaalin jäännösmäärä kokeen lopussa (mg/l)	Prosentuaalinen primaarinen hajoaminen
Siirrostettu testiliuos	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

OSA III **MUUNNELTU OECD-SEULONTAKOE** (menetelmä C.4-B)

III.1 MENETELMÄN PERIAATE

Mitattuun tilavuuteen epäorgaanista liuosta, jossa on tunnettu pitoisuus testattavaa ainetta (10–40 mg DOC/l) ainoana nimellisenä hiililähteenä, siirrostetaan 0,5 ml jätevettä liuoslitraa kohti. Seos ilmastetaan heikossa valossa tai pimeässä pitäen yllä lämpötilaa 22 ± 2 °C.

Hajoamista seurataan usein tehtävien DOC-analyysien avulla 28 päivän jakson aikana. Hajoamisaste lasketaan ilmaisemalla poistuneen DOC:n (siirrostetun taustanäytteen arvolla korjattuna) prosenttiosuus alkupitoisuudesta. Primaarisen biohajoamisen aste voidaan laskea myös inkubaation alussa ja lopussa tehtävän kemiallisen analyysin avulla.

III.2 MENETELMÄKUVAUS

III.2.1 Laite

a) erlenmeyerpulloja (tilavuudeltaan esimerkiksi 250 ml–21) DOC-analyysin edellyttämän tilavuuden mukaan,

b) ravistuskone pulloja varten (koneessa on oltava automaattinen lämpötilan säätö tai sitä on käytettävä lämpötilasäädetyssä huoneessa, ja sen on pystyttävä ylläpitämään aerobisia olosuhteita kaikissa pulloissa),

c) sopivin kalvoin varustettu suodatuslaite,

d) DOC-analysaattori,

e) liuenneen hapen määrityslaite,

f) sentrifugi.

III.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

10 ml a-liuosta sekoitetaan 80 ml:aan laimennusvettä, lisätään b-, c- ja d-liuosta 1 ml kutakin ja laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

Tässä menetelmässä siirrostukseen käytetään vain 0,5 ml jätevettä/l, joten liuosta on eräissä tapauksissa rikastettava hivenaineilla ja kasvutekijöillä. Tämä tehdään lisäämällä liuokseen jokaista lopullista liuoslitraa kohti 1 ml kutakin seuraavaa liuosta:

▼B

Hivenaineliuos:

Mangaanisulfaattitetrahydraatti, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	39,9 mg
Boorihappoa, H_3BO_3	57,2 mg
Sinkkisulfaattiheptahydraatti, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	42,8 mg
Ammoniumheptamolybdaatti $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Rautakelaatti ($FeCl_3$-etyleenidiamiinitetraetikkahappo)	100,0 mg
Liuotetaan laimennusveteen ja laimennetaan 1 000 ml:n tilavuuteen.	
Vitamiiniliuos:	
Hiivauute	15,0 mg

Hiivauute liuotetaan 100 ml:aan vettä. Liuos steriloidaan kalvolla, jonka huokoskoko on 0,2 mikronia, tai käytetään sellaisenaan.

III.2.3 **Siirrosaineen valmistelu ja esikäsittely**

Siirrosaineen lähteenä käytetään pääosin kotitalousjätevesiä puhdistavasta käsittelylaitoksesta tai laboratoriolaitoksesta saatavaa sekundaarista jätevettä. (Katso kohtia 1.6.4.2 ja 1.6.5.)

Käytetään 0,5 ml siirrosainetta epäorgaanisen liuoksen litraa kohti.

III.2.4 **Pullojen valmistelu**

Epäorgaanista liuosta pannaan 2 litran erlenmeyerpulloihin esimerkiksi 800 ml:n annoksina. Riittävä määrä testattavan aineen ja vertailuaineen kantaliuosta lisätään eri pulloihin siten, että saadaan kemikaalipitoisuus, joka vastaa pitoisuutta 10–40 ml DOC/l. Tarkistetaan pH ja säädetään se tarvittaessa arvoon 7,4. Pullot siirrostetaan 0,5 ml:lla jätevettä pulloissa olevaa liuoslitraa kohti (katso kohtaa I.6.4.2). Valmistetaan myös siirrosaineen vertailunäytteet epäorgaaniseen liuokseen, mutta ilman testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia.

Tarvittaessa testattavan kemikaalin mahdollisten inhibitooriset ominaisuudet on tarkistettava siirrostamalla yhteen pulloista epäorgaanista liuosta, jossa on vertailukelpoiset pitoisuudet testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia.

Tarvittaessa valmistetaan myös erillinen steriili pullo, jonka avulla tarkistetaan testattavan kemikaalin abioottinen hajoaminen. Tällöin käytetään kemikaalin liuosta, johon ei ole lisätty siirrosainetta (katso kohtaa I.6.6).

Jos epäillään, että testattava kemikaali adsorboituu merkittävissä määrin esimerkiksi lasiin tai lietteeseen, voidaan tehdä alustava kemikaalin adsorption todennäköisen laajuuden määritys, jonka perusteella voidaan arvioida testimenetelmän soveltuvuutta tälle kemikaalille (katso taulukkoa 1). Alustavaa määritystä varten pulloon lisätään testattavaa ainetta, siirrosainetta ja sterilointiainetta.

Kaikkien pullojen sisältö laimennetaan epäorgaanisella liuoksella yhden litran tilavuuteen. Sekoituksen jälkeen jokaisesta pullosta otetaan näyte alkuperäisen DOC-pitoisuuden määritystä varten (katso liitettä II.4). Pullojen suut peitetään esimerkiksi alumiinifoliolla siten, että ilma pääsee vapaasti vaihtumaan pullon ja ympäristön välillä. Tämän jälkeen pullot pannaan ravistuskoneeseen kokeen aloittamista varten.

▼B

III.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Pullot 1 ja 2: Testisuspensio

Pullot 3 ja 4: Siirrosaineen taustanäyte

Pullo 5: Menetelmän vertailunäyte

Seuraavia pulloja on käytettävä tarpeen mukaan, ja niiden käyttö on muutenkin suositeltavaa:

Pullo 6: Steriili abioottinen vertailunäyte

Pullo 7: Adsorption vertailunäyte

Pullo 8: Myrkyllisyystarkistus

Katso myös kohtaa I.6.7.

III.2.6 **Testin suorittaminen**

Testin aikana kunkin pullon DOC-pitoisuus määritetään kahdesti tietyin välein. Määritykset on tehtävä riittävän usein, jotta voidaan määrittää 10-päiväisen jakson alku ja prosentuaalinen poistuma tämän jakson lopussa. Määrityksiä varten otetaan pienin mahdollinen määrä testisuspensiota.

Ennen näytteenottoa pulloista haihtunut vesimäärä on kompensoitava lisäämällä pulloihin tarpeellinen määrä laimennusvettä (I.6.1). Pullojen sisältö sekoitetaan huolellisesti varmistaen, että pullojen seinämiin kiinnittynyt aines liukenee tai suspendoituu ennen näytteenottoa. Näytteet kalvosuodatetaan tai sentrifugoidaan heti näytteenoton jälkeen (katso liitettä II.4). Ellei näytteitä analysoida samana päivänä, niitä voidaan säilyttää 2–4 °C:ssa enintään 48 tuntia tai alle –18 °C:ssa, jos ne joutuvat odottamaan tätä pitempään.

III.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

III.3.1 **Tulosten käsittely**

Annetun ajankohdan t prosentuaalinen hajoaminen lasketaan kohdan I.7.1 mukaan (DOC-määritys) ja vaihtoehtoisesti kohdan I.7.2 mukaan (spesifinen analyysi).

Tulokset kirjataan jäljempänä kuvattavaan tietolomakkeeseen.

III.3.2 Tulosten hyväksyttävyys

Katso kohtaa I.5.2.

III.3.3 Raportointi

Katso kohtaa I.8.

III.4 TIETOLOMAKE

Ohessa on esimerkki tietolomakkeesta.

MUUNNELTU OECD-SEULONTAKOE

1 **LABORATORIO**

2 **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

▼B

3 **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l kemikaalina

Liuoksen alkupitoisuus, t_0: mg/l kemikaalina

4 **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittely (jos esikäsittely on tehty):

Reaktioseoksen pitoisuus suspendoitunutta kuiva-ainetta: mg/l

5 HIILIMÄÄRITYKSET

Hiilianalysaattori:

	Pullon numero		DOC-arvo n päivän jälkeen mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testattavaa kemikaalia ja siirrosainetta	1	a_1					
		a_2					
		a:n keskiarvo $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b:n keskiarvo $C_{b(t)}$					
Siirrosaineen taustanäyte ilman testattavaa kemikaalia	3	c_1					
		c_2					
		c:n keskiarvo $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d:n keskiarvo $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **LÄHDETIETOJEN ARVIOINTI**

Pullon numero		Prosentuaalinen hajoaminen n päivän jälkeen				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Pullon numero		Prosentuaalinen hajoaminen n päivän jälkeen				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Keskiarvo - (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Jos D_1- ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

7. **ABIOOTTINEN TARKISTUS** (valinnainen)

	Aika (päivää)	
	0	t
Steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus (mg/l)	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{Prosentuaalinen abioottinen hajoavuus} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPESIFINEN KEMIALLINEN ANALYYSI** (valinnainen)

	Testattavan kemikaalin jäännösmäärä kokeen lopussa (mg/l)	Prosentuaalinen primaarinen hajoaminen
Steriili vertailunäyte	s_b	
Siirrostettu testiliuos	s_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b}$ñ100

OSA IV. HIILIDIOKSIDIN MUODOSTUMISKOE (menetelmä C.4-C)

IV.1 MENETELMÄN PERIAATE

Mitattu tilavuus siirrostettua epäorgaanista liuosta, jossa on tunnettu pitoisuus testattavaa ainetta (10–20 mg DOC tai TOC/1) ainoana nimellisenä hiililähteenä, ilmastetaan johtamalla liuoksen läpi hiilidioksiditonta ilmaa, jonka virtausta säädetään. Ilmastus tehdään heikossa valossa tai pimeässä. Hajoamista seurataan 28 päivän ajan määrittämällä muodostuvan hiilidioksidin määrä. Tätä varten hiilidioksidi kerätään barium- tai natriumhydroksidiin, ja hiilidioksidimäärä mitataan titraamalla jäännöshydroksidi tai mittaamalla epäorgaanisen hiilen määrä. Testattavasta kemikaalista muodostetun hiilidioksidin määrä (korjattuna siirrostetun taustanäytteen arvolla) ilmaistaan $ThCO_2$-prosenttiarvona. Biohajoamisaste voidaan laskea myös inkubaation alussa ja lopussa tehtävän DOC-analyysin avulla.

▼B

IV.2 MENETELMÄKUVAUS

IV.2.1 **Laite**

a) pulloja (tilavuudeltaan 2–5 litraa), jotka on varustettu lähes pullon pohjaan ulottuvalla ilmastusletkulla ja ulostulolla,

b) magneettisia sekoittimia (kun tutkitaan huonosti liukenevia kemikaaleja),

c) kaasuabsorptiopulloja,

d) ilmanvirtauksen säätö- ja mittauslaite,

e) kaasunpesulaite, jonka avulla saadaan hiilidioksiditonta ilmaa (vaihtoehtoisesti voidaan käyttää painepulloista otetun hiilidioksidittoman hapen ja hiilidioksidittoman typen seosta suhteessa 20 % happea ja 80 % typpeä),

f) hiilidioksidin määrityslaite, jonka toiminta perustuu titraukseen tai epäorgaanisen hiilen analysointiin,

g) kalvosuodatin (valinnainen),

h) DOC-analysaattori (valinnainen).

IV.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

10 ml a-liuosta sekoitetaan 800 ml:aan laimennusvettä, lisätään b-, c- ja d-liuosta 1 ml kutakin ja laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

IV.2.3 **Siirrosaineen valmistelu ja esikäsittely**

Siirrosaineen lähteinä voidaan käyttää aktiivilietettä, jätevettä, pintavettä, maata tai näiden sekoitusta.

Katso kohtia I.6.4, 1.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

IV.2.4 **Pullojen valmistelu**

Seuraavassa kappaleessa kuvattavat tilavuudet ja painot koskevat 5 l:n pulloja, joissa on 3 l suspensiota. Myös tätä pienempiä tilavuuksia voidaan käyttää arvoja korjaamalla, edellyttäen, että muodostunut hiilidioksidi voidaan mitata riittävän tarkasti.

2 400 ml epäorgaanista liuosta johdetaan 5 l:n pulloihin. Pulloihin lisätään sopiva määrä valmistettua aktiivilietettä (katso kohtia I.6.4 ja I.6.5), niin että lopullisessa 3 l:n liuoksessa on enintään 30 mg suspendoitunutta kuiva-ainetta litraa kohti. Vaihtoehtoisesti voidaan ensin laimentaa valmistettu liete suspensioksi (500–1 000 mg/l epäorgaanista liuosta) ja lisätä tämän jälkeen alikvootti 5 l;n pulloon siten, että lopullinen pitoisuus on 30 mg/l. Vaihtoehtoinen menetelmä on tarkempi. Myös muita siirroslähteitä voidaan käyttää (katso kohtaa I.6.4.2).

Siirrostetuista seoksista poistetaan hiilidioksidi ilmastamalla niitä yön yli hiilidioksidittomalla ilmalla.

▼B

Testattavaa ainetta ja vertailuainetta lisätään pulloihin erikseen kantaliuoksen tunnettuna tilavuutena (jokaista pitoisuutta kohti tarvitaan kaksi pulloa), niin että pullojen sisällön DOC- tai TOC-pitoisuus on 10–20 mg/l. Muutama pullo tarvitaan siirrosainekontrolleiksi, joten niihin ei lisätä kemikaaleja. Huonosti liukenevat aineet lisätään suoraan pulloihin tunnettuna painona tai tilavuutena (katso liitettä III).

Yhden pullon avulla voidaan tarvittaessa selvittää testattavan kemikaalin inhibitoorisia ominaisuuksia. Tähän pulloon lisätään testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia, niin että niiden pitoisuudet ovat samat kuin muissa pulloissa.

Tarvittaessa selvitetään steriilin pullon ja siirrostamattoman kemikaaliliuoksen avulla, onko testattava kemikaali abioottisesti hajoavaa (katso kohtaa I.6.6). Sterilointi tehdään lisäämällä liuokseen myrkyllistä ainetta sopivana pitoisuutena.

Kaikkien pullojen suspensioiden tilavuus säädetään 3 l:ksi lisäämällä pulloihin epäorgaanista liuosta, joka on ilmastettu hiilidioksidittomalla ilmalla. Vaihtoehtoisesti pulloista voidaan ottaa näytteet DOC-analyysiä (katso liitettä II.4) tai spesifistä analyysiä varten. Kunkin pullon ilmaventtiiliin liitetään absorptiopullo.

Jos käytetään bariumhydroksidia, jokaiseen 5 l:n testipulloon liitetään sarjaan kolme absorptiopulloa, joissa kaikissa on 100 ml 0,0125-molaarista bariumhydroksidia. Liuoksessa ei saa olla saostunutta sulfaattia tai karbonaattia, ja liuoksen väkevyys on määritettävä välittömästi ennen liuoksen käyttöä. Jos käytetään natriumhydroksidia, jokaiseen testipulloon liitetään kaksi loukkua. Toisen loukun avulla tarkistetaan, että kaikki hiilidioksidi on imeytynyt ensimmäiseen loukkuun. Imeytyspulloina käytetään pullotyyppiä, jossa on seerumipullon suljin, Jokaiseen pulloon lisätään 200 ml 0,05-molaarista natriumhydroksidia. Tämä määrä riittää absorboimaan kaiken hiilidioksidin, joka syntyy testattavan kemikaalin hajoamistuotteena. Natriumhydroksidiliuos sisältää aina — myös vastavalmistettuna — pienen määrän karbonaattia, joka kompensoidaan vähentämällä taustanäytteen karbonaatin määrää.

IV.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Pullot 1 ja 2: Testisuspensio

Pullot 3 ja 4: Siirrosaineen taustanäyte

Pullo 5: Menetelmän vertailunäyte

Seuraavia pulloja on käytettävä tarpeen mukaan, ja niiden käyttö on muutenkin suositeltavaa:

Pullo 6: Steriili abioottinen vertailunäyte

Pullo 7: Myrkyllisyystarkistus

Katso myös kohtaa I.6.7.

IV.2.6 **Testin suorittaminen**

Testi aloitetaan johtamalla suspensioiden läpi hiilidioksidittomia ilmakuplia virtausnopeudella 30–100 ml/ minuutti. Hiilidioksidiabsorbentista otetaan säännöllisin välein näytteitä suspensioiden hiilidioksidipitoisuuden analyysiä varten. Ensimmäisen kymmenen päivän jakson näytteenottoväliksi suositellaan kahta tai kolmea päivää. Tämän jälkeen näytteitä otetaan joka viides päivä 28. päivään asti 10-päiväisen jakson löytämiseksi.

▼B

Päivänä 28 otetaan näytteet mahdollista DOC-analyysiä tai spesifistä analyysiä varten, mitataan suspensioiden pH ja lisätään jokaiseen pulloon 1 ml väkevää suolahappoa. Tämän jälkeen hiilidioksidi poistetaan testisuspensioista yön yli jatkuvalla pullojen ilmastuksella, Viimeinen hiilidioksidianalyysi tehdään 29. päivänä.

Hiilidioksidianalyysipäivinä pulloa lähinnä oleva bariumhydroksidiimeytin irrotetaan pullosta ja hydroksidiliuos titrataan 0,05-molaarisella suolahapolla. Indikaattorina käytetään fenoliftaleiinia. Sarjan jäljellä olevat imeyttimet siirretään lähemmäksi testipulloa, ja sarjan loppuun lisätään uusi, 100 ml tuoretta 0,0125-molaarista bariumhydroksidia sisältävä imeytin. Titrauksia tehdään tarvittaessa (jos esimerkiksi ensimmäiseen loukkuun kertyy paljon sakkaa, titraus on tehtävä ennen kuin sakkaa alkaa kertyä toiseen loukkuun) — kuitenkin vähintään viikoittain. Jos absorbenttina käytetään natriumhydroksidia, ruiskuun imetään pieni määrä natriumhydroksidiliuosta (tarvittava määrä vaihtelee käytettävän hiilianalysaattorin mukaan) lähinnä testipulloa olevasta imeyttimestä. Jos muodostunut hiilidioksidi halutaan analysoida heti, näyte ruiskutetaan hiilianalysaattorin epäorgaaniseen hiileen.

Toisen loukun sisältö analysoidaan vain testin lopussa, jotta hiilidioksidin mahdollisen läpipääsyn aiheuttama virhe voitaisiin korjata.

IV.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

IV.3.1 **Tulosten käsittely**

Imeyttimeen jäänyt hiilidioksidimäärä lasketaan titrauksen jälkeen seuraavan suureyhtälön avulla:

$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$

jossa

V = imeyttimen 100 ml:n sisällön titraukseen käytetty suolahappo (ml)

C_B = bariumhydroksidiliuoksen väkevyys (M)

C_A = suolahappohuoksen väkevyys (M).

Jos C_B = 0,0125 M, C_A = 0,05 M ja 100 ml:n puhtaan bariumhydroksidiliuoksen titraustulokseksi saadaan 50 ml, hiilidioksidin paino voidaan laskea seuraavasti:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI titrattu} = 1,1 \times \text{ml HCI}$$

Tässä tapauksessa titraukseen käytetty suolahappotilavuus voidaan muuntaa hiilidioksidin painoksi käyttämällä kerrointa 1,1.

Titrausarvojen avulla lasketaan pelkän siirrosaineen ja siirrosaineen ja testattavan kemikaalin seoksen muodostaman hiilidioksidin painot. Näiden painojen ero vastaa pelkän testattavan kemikaalin muodostaman hiilidioksidin painoa.

Jos esimerkiksi pelkän siirrosaineen titrauksesta saadaan tulokseksi 48 ml ja siirrosaineen sekä testattavan kemikaalin seoksen titrauksesta 45 ml, määrät ovat seuraavat:

Siirrosaineen CO_2 = 1,1 x (50 - 48) = 2,2 mg.

▼B

Siirrosaineen ja testattavan kemikaalin seoksen CO_2 = 1,1 x (50 - 45) = 5,5 mg.

Täten testattavan kemikaalin muodostama CO_2 = 3,3 mg.

Prosentuaalinen biohajoavuus lasketaan seuraavan suureyhtälön avulla:

$$\text{hajoaminen } (\%) = \frac{\text{muodostunut } CO_2 \text{ (mg)} \times 100}{ThCO_2 \times \text{lisätty määrä testattavaa kemikaalia (mg)}}$$

tai

$$\text{hajoaminen } (\%) = \frac{\text{muodostunut } CO_2 \text{ (mg)} \times 100}{\text{lisätty TOC} - \text{määrä} \times 3,67}$$

jossa 3,67 on hiili-hiilidioksidimuunnoskerroin.

Minkä tahansa aikavälin jälkeinen prosentuaalinen hajoaminen saadaan kumuloimalla kunkin päivän laskettujen $ThCO_2$-arvojen prosenttiluvut mittaushetkeen asti.

Natriumhydroksidiabsorbenteille muodostetun hiilidioksidin määrä voidaan laskea milligrammoina epäorgaanista hiiltä (IC) kertomalla absorbentin IC-pitoisuus absorbentin tilavuudella.

Prosentuaalinen hajoaminen voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$ThCO_2 - \% = \frac{\text{testipullon mg IC} - \text{vertailunäytten mg IC}}{\text{testattavan kemikaalin mukana lisätty mg TOC}} \times 100$$

DOC-poistumat voidaan haluttaessa laskea kohdan I.7 mukaan. Tulokset kirjataan tietolomakkeelle yhdessä muiden tulosten kanssa.

IV.3.2 **Tulosten hyväksyttävyys**

Testin alussa epäorgaanisessa liuoksessa olevan kemikaalisuspension IC-pitoisuus saa olla enintään 5 % TC-arvosta, ja testin lopussa siirrostuksen taustahuoksen hiilidioksidin kokonaismuodoslus saa yleensä olla enintään 40 mg/l. Jos tulokseksi saadaan 70 mg CO_2/l ylittäviä arvoja, tietoja ja koetekniikoita on tarkasteltava erityisen kriittisesti.

Katso myös kohtaa I.5.2.

IV.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

IV.4 TIETOLOMAKE

Ohessa on esimerkki tietolomakkeesta.

HIILIDIOKSIDIN MUODOSTUMISKOE

1. **LABORATORIO**

2. **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

3. **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l kemikaalina

▼B

Liuoksen alkupitoisuus, t_0: mg/l kemikaalina

Pulloon lisätty kokonaismäärä hiiltä (C): mg C

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittely (jos esikäsittely on tehty):

Reaktioseoksen pitoisuus suspendoitunutta kuiva-ainetta: mg/l

5. **HIILIDIOKSIDIN MUODOSTUS JA HAJOAVUUS**
Menetelmä: $Ba(OH)_2$/NaOH/muu

Aika (päivä)	Testiliuoksen muodostunut CO_2 (mg)		Taustanäytteen muodostunut CO_2 (mg)		Kumulatiivinen muodostunut CO_2 (testiliuos vähennettynä taustaliuoksen keskiarvolla)		$ThCO_2$ kumulatiivinen $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	keskiarvo	3 / 4	keskiarvo	1	2	1	2	keskiarvo
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

6. **HIILIANALYYSI** (valinnainen)

Hiilianalysaattori:

Aika (päivä)	Taustanäyte mg/l	Testattava kemikaali mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) tai inkubaation lopussa

▼B

$$\text{DOC} - \text{poistuma } (\%) = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOOTTINEN HAJOAMINEN** (valinnainen)

$$\text{Abioottinen hajoaminen } (\%) = \frac{\text{Steriilin pullon } CO_2 - \text{muodostus 28. päivän jälkeen (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

OSA V **MANOMETRINEN RESPIROMETRIAKOE** (menetelmä C.4-D)

V.1 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Mitattua tilavuutta siirrostettua epäorgaanista liuosta, jossa on tunnettu pitoisuus testattavaa kemikaalia (100 mg kemikaalia/l testattavaa ainetta — ThOD-pitoisuus vähintään 50–100 mg/l) ainoana nimellisenä orgaanisena hiililähteenä, ravistetaan suljetussa pullossa vakiolämpötilassa (vaihteluväli enintään ± 1 °C) enintään 28 päivän ajan. Hapenkulutus määritetään joko mittaamalla (elektrolyyttisesti muodostettu) happimäärä, joka tarvitaan pitämään respirometripullon kaasun tilavuus vakiona, tai mittaamalla laitteen tilavuuden tai paineen muutos (tai molempien yhdistelmä). Muodostunut hiilidioksidi imeytetään kaliumhydroksidiliuokseen tai muuhun sopivaan absorbenttiin. Testattavan kemikaalin hapenkulutus (korjattuna pelkän siirrosaineen hapenkulutuksella, joka mitataan rinnakkaisen taustanäytteen avulla) ilmaistaan ThOD- tai COD-prosenttiarvona. Haluttaessa voidaan laskea myös primaarinen biohajonta inkubaation alussa ja lopussa tehtävän spesifisen analyysin tuloksien avulla tai määrittää lopullinen biohajonta DOC-analyysin avulla.

V.2 MENETELMÄKUVAUS

V.2.1 **Laite**

a) tarkoitukseen sopiva respirometri,

b) lämpötilan säätöjärjestelmä (enintään ± 1 °C:n vaihteluväli),

c) kalvosuodatin (valinnainen),

d) hiilisuodatin (valinnainen).

V.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

10 ml a-liuosta sekoitetaan 800 ml:aan laimennusvettä, lisätään 1 ml b-, c- ja d-liuosta sekä laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

V.2.3 **Siirrosaineen valmistelu ja esikäsittely**

Siirrosaineen lähteinä voidaan käyttää aktiivilietettä, jätevettä, pintavettä, maata tai näiden sekoitusta.

Katso kohtia I.6.4, I.6.4.1,1.6.4.2 ja I.6.5.

V.2.4 **Pullojen valmistelu**

Valmistetaan erilliset erät testi- ja kontrolliliuosta liuottamalla testattavaa ainetta ja vertailuainetta epäorgaaniseen liuokseen (100 mg kemikaalia/l — vähintään 50–100 mg ThOD/1) kantaliuoksia käyttäen.

▼B

ThOD-arvo lasketaan käyttäen oletuksena ammoniumsuolojen muodostusta, ellei odotettavissa ole nitrifikaatiota, missä tapauksessa laskelmien on perustuttava nitraattien muodostukseen (katso liitettä II.2).

Määritetään pH-arvot ja säädetään ne tarvittaessa

arvoon 7,4 ± 0,2. Huonosti liukenevat aineet lisätään myöhemmin (katso jäljempänä).

Testattavan kemikaalin myrkyllisyysmäärityksissä epäorgaaniseen liuokseen on valmistettava erillinen liuos, jossa on testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia samoina pitoisuuksina kuin yksittäisissä liuoksissa.

Jos tarvitaan hapen fysikaalis-kemiallisen kulutuksen mittauksia, valmistetaan liuos, jossa on testattavaa kemikaalia pitoisuutena, joka vastaa arvoa 100 mg ThOD/1. Liuos steriloidaan lisäämällä siihen sopivaa myrkyllistä ainetta (katso kohtaa I.6.6).

Lisätään tarvittavat tilavuudet testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia vähintään kahteen pullosarjaan. Tarvittaessa lisätään erillisiin pulloihin pelkkää epäorgaanista liuosta (siirrostarkistusta varten), testattavan kemikaalin ja vertailukemikaalin seosliuosta sekä steriiliä liuosta.

Jos testattava kemikaali on huonosti liukenevaa, se voidaan lisätä tässä vaiheessa tunnettuna painomääränä tai sitä voidaan käsitellä liitteessä III kuvatulla tavalla. Hiilidioksidi-imeyttimiin lisätään kaliumhydroksidia, kalkkisoodapellettejä tai muuta absorbenttia.

V.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Pullot 1 ja 2: Testisuspensio

Pullot 3 ja 4: Siirrosaineen taustanäyte

Pullo 5: Menetelmän vertailunäyte

Seuraavia pulloja on käytettävä tarpeen mukaan, ja niiden käyttö on muutenkin suositeltavaa:

Pullo 6: Steriili vertailunäyte

Pullo 7: Myrkyllisyystarkistus

Katso myös kohtaa I.6.7.

V.2.6 **Testin suorittaminen**

Kun pullojen lämpötila on oikea, niihin siirrostetaan valmistettua aktiivilietettä tai muuta siirrosainetta testiohjelman mukaan. Suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus saa olla enintään 30 mg/l. Pullot pannaan ravistuslaitteeseen, joka käynnistetään. Pullojen ilmatiiviyden tarkastuksen jälkeen aloitetaan hapenkulutuksen mittaukset. Ohjelmanmukaisten mittausten lisäksi ei yleensä tarvita muuta valvontaa kuin päivittäisiä lämpötilan ja ravistustoiminnon tarkastuksia,

Hapenkulutus lasketaan säännöllisten ja tiheiden mittausten tulosten perusteella laitevalmistajan ohjeiden mukaan. Inkubaation lopussa (yleensä 28 päivän kuluttua) mitataan pulloissa olevien liuosten pH-arvot, mikä on erityisen tärkeää, jos hapenkulutusarvot ovat pieniä tai suurempia kuin $ThOD_{NH4}$ (typpeä sisältävät yhdisteet).

▼B

Tarvittaessa kokeen alussa ja lopussa otetaan respirometripulloista näytteet DOC:n tai spesifisen kemikaalin analyysiä varten (katso liitettä II.4). Kokeen alussa tehtävän näytteenoton yhteydessä on varmistettava, että pulloon jäljelle jäävä testisuspension tilavuus on tunnettu. Kun happea kuluttava yhdiste sisältää typpeä, nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien suureneminen 28 päivän aikana määritetään nitrifikaation vaatima hapenkulutus huomioon ottaen (katso liitettä V).

V.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

V.3.1 **Tulosten käsittely**

Testattavan kemikaalin hapenkulutus (mg) tunnetun ajan kuluessa (korjattuna siirrostetun taustanäytteen hapenkulutuksella) jaetaan testattavan kemikaalin käytetyllä painolla. Tulokseksi saadaan BOD-arvo ilmaistuna hapen painona testattavan kemikaalin painoa kohti:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{testattavan kemikaalin } O_2 \text{ – kulutus (mg) – taustanäytten } O_2 \text{ – kulutus (mg)})}{(\text{pullossa olevan testattavan kemikaalin määrä (mg)})}$$

= mg O2 mg:aa testattavaa kemikaalia kohti

Prosentuaalinen biohajoavuus voidaan laskea näin:

$$\text{Prosentuaalinen biohajoavuus} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikaalia})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ kemikaalia})} \times 100$$

tai näin:

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikaalia})}{\text{COD}(\text{mg } O_2 \text{ kemikaalia})} \times 100$$

Huomautus: Molemmat menetelmät eivät välttämättä anna tulokseksi samaa arvoa. Jälkimmäisen menetelmän käyttöä suositellaan.

Kun testattava aine sisältää typpeä, käytetään joko NH_4:n tai NO_3:n perusteella laskettua ThOD-arvoa sen mukaan, mitä nitrifikaation esiintymisen suhteen on odotettavissa (katso liitettä II.2). Jos nitrifikaatio on vain osittaista, nitrifikaation hapenkulutuksen korjaus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutoksen perusteella (katso liitettä V).

Jos tehdään myös orgaanisen hiilen tai spesifisen kemikaalin määritykset, prosentuaalinen hajoaminen lasketaan kohdassa I.7 kuvatun menetelmän mukaan.

Tulokset kirjataan oheisiin tietolomakkeisiin.

V.3.2 **Tulosten hyväksyminen**

Siirrostuksen taustanäytteen hapenkulutus on yleensä 20–30 mg O_2/l. Arvo saa olla 28 päivän kuluessa enintään 60 mg/l. Jos arvo on tätä suurempi, tietoja ja koetekniikoita on tarkasteltava erityisen kriittisesti. Jos pH-arvo on alueen 6–8,5 ulkopuolella ja testattavan kemikaalin hapenkulutus on alle 60 %, testattavan kemikaalin pitoisuutta on pienennettävä ja testi on toistettava.

Katso myös kohtaa I.5.2.

▼B

V.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

V.4 **TIETOLOMAKE**

Jäljempänä on esimerkki tietolomakkeesta.

MANOMETRINEN RESPIROMETRIAKOE

1. **LABORATORIO**

2. **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

3. **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l

Liuoksen alkupitoisuus, C_o: mg/l

Testipullon tilavuus (V): ml

ThOD tai COD: mg O_2 / mg testattavaa ainetta (NH_4, NO_3)

4. **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittelyt:

Seoksen suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus: mg/l

5. **HAPENKULUTUS: BIOHAJOAVUUS**

		Aika (päivää)											
		0		7		14			21			28	
O_2-kulutus (mg), testattava kemikaali	1												
	2												
	a, keskiarvo												
O_2-kulutus (mg), taustanäyte	3												
	4												
	b, keskiarvo												
Korjattu BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD mg:aa testattavaa kemikaalia kohti	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Aika (päivää)											
		0		7		14			21			28	
Hajoaminen (%) $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Keskiarvo (*)												

V = testipullon sisällön tilavuus
(*) Jos D_1- ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää.

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

6. **NITRIFIKAATIOKORJAUS** (katso liitettä V)

Päivä		0	28	Erotus
(i)	Nitraattipitoisuus (mg N/litra)			(N)
(ii)	Happiekvivalentti (4,57 x N x V (mg)	—	—	
(iii)	Nitriittipitoisuus (mg N/litra)			(N)
(iv)	Happiekvivalentti (3,43 x N x V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Kokonaishappiekvivalentti	—	—	

7. **HIILIANALYYSI** (valinnainen)

Hiilianalysaattori:

Aika (päivä)	Taustanäyte (mg/l)	Testattava kemikaali (mg/l)
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) tai inkubaation lopussa

$$\text{Prosentuaalinen DOC} - \text{poistuma} = (1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}) \times 100$$

8. **SPESIFINEN KEMIKAALI** (valinnainen)

S_b = fysikaalis-kemiallisen (steriilin) vertailunäytteen pitoisuus 28 päivän kuluttua

S_a = siirrostettujen pullojen pitoisuus 28 päivän kuluttua

$$\text{Prosentuaalinen biohajoavuus} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOOTTINEN HAJOAVUUS** (valinnainen)

a = steriilien pullojen hapenkulutus (mg) 28 päivän kuluttua

$$\text{hapenkulutus mg : aa testattavaa kemikaalia kohti} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(Katso jaksoja 1 ja 3.)

$$\text{Prosentuaalinen abioottinen hajoavuus} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

hapenkulutus mg:aa testattavaa kemikaalia kohti =

OSA VI **SULJETUN PULLON MENETELMÄ** (menetelmä C.4-E)

VI.1 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testattavan kemikaalin ja epäorgaanisen liuoksen seokseen (2–5 mg kemikaalia/l) siirrostetaan suhteellisen pieni määrä sekapopulaatiosta otettuja mikroeliöitä. Näin saatua seosta pidetään täysissä, suljetuissa pulloissa pimeässä ja vakiolämpötilassa. Hajoamista seurataan analysoimalla liuennutta happea 28 päivän ajan. Testattavan kemikaalin hapenkulutus vähennettynä siirrostetun taustanäytteen hapenkulutuksella ilmaistaan ThOD- tai COD-prosenttilukuna.

VI.2 MENETELMÄKUVAUS

VI.2.1 **Laite**

a) Lasitulpalla varustettuja BOD-pulloja (vetoisuudeltaan esimerkiksi 250–300 ml).

b) Vesihaude tai inkubaattori, jossa pulloja voidaan pitää vakiolämpötilassa (vaihteluväli enintään ± 1 °C) ja pimeässä.

c) Suuria lasipulloja (2–5 l) epäorgaanisen liuoksen valmistusta ja BOD-pullojen täyttöä varten.

d) Happielektrodi ja happimittari tai Winkler-titrauksen edellyttämät varusteet ja reagenssit.

VI.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

Sekoitetaan a-, b-, c- ja d-liuosta 1 ml kutakin ja laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

VI.2.3 **Siirrosaineen valmistelu**

Siirrosaine saadaan yleensä pääosin kotitalouksien jätevettä käsittelevän laitoksen tai laboratoriolaitoksen sekundaarisesta jätevedestä. Myös pintavettä voidaan käyttää. Yleensä käytetään 0,05–5 ml suodosta epäorgaanisen liuoksen litraa kohti. Tarvittaessa määrätystä päästövedestä saadun siirrosaineen optimaalinen testitilavuus on määritettävä kokeellisesti (katso kohtia I.6.4.2 ja I.6.5).

VI.2.4 **Pullojen valmistelu**

Epäorgaanista liuosta ilmastetaan voimakkaasti 20 minuutin ajan. Jokaiseen testisarjaan on käytettävä samasta erästä otettua epäorgaanista liuosta. Epäorgaaninen liuos on yleensä käyttövalmis, kun sitä on pidetty testilämpötilassa 20 tunnin ajan. Tarkistuksena määritetään liuenneen hapen pitoisuus, jonka arvo saa olla enintään 9 mg/l liuoksen lämpötilan ollessa 20 °C. Ilmalla kyllästetyn liuoksen kaikki siirrot ja täytöt on tehtävä kuplia välttäen, esimerkiksi sifonien avulla.

▼B

Valmistellaan rinnakkaiset ryhmät BOD-pulloja, joiden avulla voidaan toteuttaa rinnakkaisia koesarjoja testattavan kemikaalin ja vertailukemikaalin määritystä varten. BOD-pulloja on valmisteltava sellainen määrä (siirrosaineen taustanäytepullot mukaan lukien), että voidaan tehdä vähintään kaksinkertaiset hapenkulutuksen mittaukset halutuin välein (esimerkiksi 0, 7, 14, 21 ja 28 päivän kuluttua). Joissakin tapauksissa suurempi määrä pulloja on tarpeen 10-päiväisen jakson löytämiseksi.

Ilmalla kyllästettyä epäorgaanista liuosta kaadetaan suuriin pulloihin. Pullot täytetään kolmannekseen asti. Sitten eri pulloihin lisätään riittävä määrä testattavan kemikaalin ja vertailukemikaalin kantaliuosta, niin että kemikaalien lopullinen pitoisuus on enintään 10 mg/l. Erillisessä suuressa pullossa olevaan taustanäytteeseen ei lisätä kemikaaleja.

Siirrosaineen aktiviteetin varmistamiseksi BOD-pullojen liuenneen hapen pitoisuutta ei saa päästää alle arvon 0,5 mg/l, mikä rajoittaa testattavan kemikaalin pitoisuuden arvoon 2 mg/l. Jos yhdiste on huonosti liukenevaa tai jos sillä on pieni ThOD-arvo, voidaan käyttää pitoisuutta 5–10 mg/l. Joissakin tapauksissa on suositeltavaa ajaa rinnakkaisia testisarjoja kahta eri pitoisuutta (esimerkiksi arvoja 2 mg/l ja 5 mg/l) käyttäen. ThOD-arvo lasketaan yleensä ensisijaisesti ammoniumsuolojen muodostuksesta, ellei odotettavissa ole nitrifikaatiota, missä tapauksessa laskelmien on perustuttava nitraattien muodostukseen ($ThOD_{NO3}$, katso liitettä II.2). Jos nitrifikaatio on vain osittaista, nitrifikaation hapenkulutuksen korjaus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutoksen perusteella (katso liitettä V).

Jos on tarpeen määrittää testattavan kemikaalin myrkyllisyys (jos esimerkiksi aiempien kokeiden tuloksena on saatu pieni biohajoavuusarvo), myrkyllisyysmääritystä varten on valmisteltava erillinen pullosarja.

Erilliseen suureen pulloon lisätään ilmastettua epäorgaanista liuosta (suunnilleen kolmannes pullon tilavuudesta), testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia, niin että lopulliset pitoisuudet ovat samat kuin muissa suurissa pulloissa.

Suurissa pulloissa olevat liuokset siirrostetaan sekundaarisella jätevedellä (0,5–5 ml/l) tai muulla siirrosaineella (esimerkiksi jokivedellä, katso kohtaa I.6.4.2). Lopuksi pullojen sisältö laimennetaan epäorgaanisella liuoksella täyteen tilavuuteen. Riittävä sekoittuminen varmistetaan käyttämällä pullon pohjaan asti ulottuvaa letkua.

VI.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Tyyppillisessä ajossa käytetään seuraavia pulloja:

— vähintään 10:tä pulloa, joissa on testattavaa kemikaalia ja siirrosainetta (testisuspensio),

— vähintään 10:tä pulloa, jossa on pelkkää siirrosainetta (siirrosaineen taustanäyte),

— vähintään 10:tä pulloa, jossa on vertailukemikaalia ja siirrosainetta (menetelmän tarkistusnäyte).

▼B

— Tarvittaessa käytetään lisäksi 6:ta pulloa, joissa on testattavaa kemikaalia, vertailukemikaalia ja siirrosainetta (myrkyllisyystarkistus). 10-päiväisen jakson löytämisen varmistamiseksi tarvitaan kuitenkin kaksinkertainen pullomäärä.

VI.2.6 Testin suorittaminen

Kutakin valmisteltua liuosta annostellaan heti vastaaviin BOD-pulloryhmiin letkulla, joka ulottuu suuren pullon alimpaan neljännekseen (ei pohjaan). BOD-pullot täytetään kokonaan. Ilmakuplat poistetaan koputtamalla pulloja kevyesti. Nollahetkipullojen liuenneen hapen määritys tehdään heti Winkler- tai elektrodimenetelmällä. Pullojen sisältö voidaan säästää myöhemmin tehtävää Winkler-analyysia varten lisäämällä pulloihin mangaani(II)sulfaattia ja natriumhydroksidia (ensimmäistä Winkler-reagenssia). Huolella suljettuja pulloja, joissa happi on sidottuna ruskeaan mangaani(III)oksidihydraattiin, säilytetään pimeässä 10–20 °C:ssa enintään 24 tuntia ennen Winkler-menetelmän seuraavien vaiheiden aloittamista. Loput rinnakkaispullot suljetaan varmistaen, ettei pulloihin jää ilmakuplia, minkä jälkeen pulloja inkuboidaan pimeässä 20 °C:ssa. Jokaista pullosarjaa kohti on käytettävä kattavaa rinnakkaissarjaa, joka sisältää siirrostettua taustanäytettä. Jokaisesta sarjasta on poimittava koko 28 päivän inkubaatiojakson ajan säännöllisin välein (vähintään kerran viikossa) vähintään kaksi pulloa liuenneen hapen analyysiä varten.

Viikoittaisten näytteiden avulla pitäisi voida arvioida prosentuaalinen poistuma 14-päiväisen jakson aikana, ja 3–4 päivän välein tapahtuvan näytteenoton avulla pitäisi voida määrittää 10-päiväinen jakso, mikä edellyttää noin kaksinkertaisen pullomäärän käyttöä.

Jos testattava aine sisältää typpeä, nitrifikaation aiheuttama hapenkulutus on otettava huomioon. Korjaus tehdään määrittämällä ensin liuenneen hapen pitoisuus O_2-elektrodilla, minkä jälkeen BOD-pullosta otetaan näyte nitriitti- ja nitraattianalyysia varten. Hapenkulutus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuden kasvun perusteella (katso liitettä V).

VI.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

V.3.1 **Tulosten käsittely**

Ensin lasketaan kunkin jakson jälkeinen BOD-arvo vähentämällä siirrosaineen taustanäytteen hapenpoistuma (mg O_2/l) testattavan aineen hapenpoistumasta. Näin korjattu poistuma jaetaan testattavan kemikaalin pitoisuudella (mg/l), jolloin saadaan spesifinen BOD-arvo ilmaistuna hapen painona (mg) testattavan kemikaalin painoa (mg) kohti. Prosentuaalinen biohajoavuus lasketaan jakamalla spesifinen BOD-arvo spesifisellä liitteen II.2 mukaan lasketulla ThOD-arvolla tai liitteessä II.3 esitettävän analyysin avulla määritetyllä COD-arvolla seuraavasti:

$$\text{BOD} = \frac{\text{testattavan kemikaalin } O_2 \text{ – kulutus (mg)} - \text{taustanäytten } O_2 \text{ – kulutus (mg)}}{\text{pullossa olevan testattavan kemikaalin määrä (mg)}}$$

▼B

= mg O_2 mg:aa testattavaa kemikaalia kohti

$$\text{Prosentuaalinen hajoavuus} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg kemikaalia)}}{\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg kemikaalia)}} \times 100$$

tai

$$\text{Prosentuaalinen hajoavuus} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg kemikaalia)}}{\text{COD(mg } O_2/\text{mg kemikaalia)}} \times 100$$

On otettava huomioon, että molemmat menetelmät eivät välttämättä anna tulokseksi samaa arvoa. Ensin mainitun menetelmän käyttöä suositellaan.

Jos testattava aine sisältää typpeä, on käytettävä NH_4:n tai NO_3:n perusteella laskettua ThOD-arvoa sen mukaan, mitä nitrifikaation suhteen on odotettavissa (katso liitettä II.2). Jos nitrifikaatio on vain osittaista, nitrifikaation hapenkulutuksen korjaus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutoksen perusteella (katso liitettä V).

VI.3.2 **Tulosten hyväksyminen**

Kun 28 päivää on kulunut, siirrostuksen taustanäytteen hapenpoistuma ei saa ylittää arvoa 1,5 mg liuennutta happea litraa kohti. Jos arvo on suurempi, koetekniikoita on tarkasteltava erityisen kriittisesti. Testipullojen hapen jäännöspitotsuus ei saa missään vaiheessa alittaa arvoa 0,5 mg/l. Näin pienet happipitoisuudet ovat hyväksyttäviä vain siinä tapauksessa, että liuenneen hapen määritysmenetelmä on riittävän tarkka mittaamaan tällaisia pitoisuuksia.

Katso myös kohtaa I.5.2.

VI.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa 1.8.

VI.4 TIETOLOMAKE

Jäljempänä on esimerkki tietolomakkeesta.

SULJETUN PULLON MENETELMÄ

1. **LABORATORIO**

2. **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

3. **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l

Liuoksen alkupitoisuus: mg/l

ThOD tai COD: mg O_2 / mg testattavaa ainetta

4. **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

▼B

Esikäsittelyt:

Pitoisuus testiseoksessa: mg/l

5. **DO-MÄÄRITYS**

Menetelmä: Winkler/elektrodi

Pulloanalyysit

Inkubaatioaika (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Taustanäyte (ilman kemikaalia)	1	C_1				
	2	C_2				
Keskiarvo	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testattava kemikaali	1	a_1				
	2	a_2				
Keskiarvo	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

6. **NITRIFIKAATIOKORJAUS** (katso liitettä V)

Inkubaatioaika (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Nitraattipitoisuus (mg N/l)				
(ii)	Nitraattipitoisuuden muutos (mg N/l)	—			
(iii)	Happiekvivalentti (mg/l)	—			
(iv)	Nitriittipitoisuus (mg N/l)				
(v)	Nitriittipitoisuuden muutos (mg N/l)	—			
(vi)	Happiekvivalentti (mg/l)	—			
(ii + vi)	Kokonaishappiekvivalentti (mg/l)	—			

7. **DO-VÄHENNYS: PROSENTUAALINEN HAJOAMINEN**

	Vähennys päivän n jälkeen (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
PULLO 1: (m_{to} - m_{tx}) (m_{bo} - m_{bx})				
PULLO 2: (m_{to} rm_{tx}) (m_{bo} - m_{bx})				

▼B

	Vähennys päivän n jälkeen (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
PULLO 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{testipitoisuus} \times \text{kemikaalin ThOD}}$				
PULLO 2: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{testipitoisuus} \times \text{kemikaalin ThOD}}$				
% D keskiarvo (*) = $\frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Jos D_1 ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää.

m_{t0} = testipullon arvo hetkellä 0

m_{tx} = testipullon arvo hetkellä x

m_{b0} = taustanäytteen keskiarvo hetkellä 0

m_{bx} = taustanäytteen keskiarvo hetkellä x

Käytetään myös osan 6, kohtien iii ja vi mukaista nitrifikaatiokorjausta.

8. **TAUSTANÄYTTEEN DO-VÄHENNYKSET**

Taustanäytteen hapenkulutus on (m_{b0}-m_{b28}) mg/l. Taustanäytteen hapenkulutus on tärkeä tekijä kokeen hyväksyttävyyden kannalta. Hapenkulutus ei saa ylittää arvoa 1,5 mg/l.

OSA VII **MITI-KOE** (menetelmä C.4-F)

VII. 1 MENETELMÄN PERIAATE

Testattavaa kemikaalia lisätään epäorgaaniseen liuokseen, jota siirrostetaan erikoisviljelmästä otetuilla, adaptoimattomilla mikroeliöillä. Liuosta tai suspensiota hämmennetään ja sen hapenkulutusta mitataan automaattisella laitteella 28 päivän ajan pimennetyssä ja suljetussa respirometrissä lämpötilassa 25 ± 1 °C. Muodostunut hiilidioksidi imeytetään kalkkisoodaan. Biohajoavuus ilmaistaan prosentuaalisena hapenkulutuksena (taustanäytteen kulutuksella korjattuna) teoreettisesta hapenkulutuksesta (ThOD). Prosentuaalinen primaarinen biohajoavuus lasketaan spesifisen, inkubaation alussa ja lopussa tehtävän kemiallisen analyysin perusteella. Lisäksi voidaan tehdä DOC-analyysi.

VII.2 MENETELMÄKUVAUS

VII.2.1 **Laite**

a) Automaattinen elektrolyyttinen BOD-mittari tai respirometri, jossa on 6 kpl 300 ml:n pulloja ja kupit CO_2-absorbenttia varten

▼B

b) Huone, jossa on vakiolämpötila, tai vesihaude, jonka lämpötila voidaan pitää arvossa 25 °C (suurin sallittu vaihteluväli ± 1 °C)

c) Kalvosuodatinlaite (valinnainen)

d) Hiilianalysaattori (valinnainen).

VII.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Valmistetaan seuraavat kantaliuokset käyttäen analyyttisen puhtaita reagensseja ja vettä (I.6.1):

a)	Monokaliumdivetyortofosfaattia, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliummonovetyortofosfaattia, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriummonovetyortofosfaattidodekahydraattia, Na_2HPO_4 x $12H_2O$	44,60 g
	Ammoniumkloridia, NH_4Cl	1,70 g
	Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.	
	Liuoksen pH-arvon on oltava 7,2.	
b)	Magnesiumsulfaattiheptahydraattia, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.	
c)	Kalsiumkloridia, $CaCl_2$	27,50 g
	Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.	
d)	Rauta(III)kloridiheksahydraattia, $FeCl_3$ x $6H_2O$	0,25 g
	Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.	

Otetaan 3 ml kutakin liuosta a, b, c ja d ja laimennetaan litran tilavuuteen.

VII.2.3 **Siirrosaineen valmistelu**

Kerätään tuoreita näytteitä vähintään kymmenestä paikasta, pääosin alueilta, joilla käytetään ja päästetään useita eri kemikaaleja. Kerätään esimerkiksi kuntien ja teollisuuslaitosten jätevesilaitoksista, joista, järvistä ja muista sopivista paikoista 1 l:n näytteitä (esimerkiksi lietettä, pintamaata ja vettä), jotka sekoitetaan huolellisesti. Kelluva aines poistetaan. Kun seos on laskeutunut, pintalietteen pH säädetään natriumhydroksidilla tai fosforihapolla arvoon 7 ± 1.

Sopiva tilavuus suodatettua pintalietettä lisätään aktiivilieteastiaan ja nestettä ilmastetaan noin 23,5 tunnin ajan. Kolmekymmentä minuuttia ilmastuksen päättymisen jälkeen suunnilleen kolmasosa pintalietteestä kaadetaan pois ja laskeutuneeseen aineeseen lisätään poiskaadettua liuosta vastaava määrä liuosta, jonka pH-arvo on 7 ja joka sisältää 0,1 % glukoosia, 0,1 % peptonia ja 0,1 % monokaliumortofosfaattia. Tämän jälkeen ilmastus käynnistetään uudelleen. Menettely toistetaan kerran päivässä. Lietejärjestelmän käytössä on noudatettava huolellisuutta: päästövesien on oltava kirkkaita, lämpötila on pidettävä arvossa 25 ± 2 °C, pH-arvon on oltava 7 ± 1, lietteen on laskeuduttava hyvin, ilmastuksen on oltava riittävää liuoksen jatkuvan aerobisuuden varmistamiseksi, lietteessä on oltava yksisoluisia eliöitä ja lietteen aktiivisuutta on testattava vertailuaineeseen verrattuna vähintään joka kolmas kuukausi. Lietettä ei saa käyttää siirrosaineena, ennen kuin se on ollut järjestelmässä vähintään kuukauden. Neljä kuukautta vanhempaa lietettä ei saa käyttää. Tämän jälkeen näytteitä on otettava vähintään 10 paikasta säännöllisin väliajoin (kerran kolmessa kuukaudessa).

▼B

Jotta tuoreen ja vanhan lietteen aktiivisuus voitaisiin pitää samalla tasolla, käytössä olevan aktiivilietteen suodatettua pintalietettä sekoitetaan samaan tilavuuteen vastavalmistettua sekoitetta, jonka osat ovat peräisin 10:stä eri paikasta. Tämän jälkeen seosta viljellään edellä kuvatulla tavalla. Lietettä otetaan siirrosaineeksi 18–24 tuntia yksikön syötön jälkeen.

VII.2.4 **Pullojen valmistelu**

Valmistellaan seuraavat kuusi pulloa:

Pullo 1: testattavaa kemikaalia laimennusvedessä (100 mg/l)

Pullot 2, 3 ja 4: testattavaa kemikaalia epäorgaanisessa liuoksessa (100 mg/l)

Pullo 5: vertailukemikaalia (esimerkiksi aniliinia) epäorgaanisessa liuoksessa (100 mg/l)

Pullo 6: pelkkää epäorgaanista liuosta.

Huonosti liukenevia testattavia kemikaaleja lisätään suoraan painon tai tilavuuden mukaan, tai niitä käsitellään liitteessä II kuvattavalla tavalla (liuottimia tai emulgaattoreita ei kuitenkaan saa käyttää). Imeytinkuppeihin lisätään CO_2-absorbenttia. Pullojen 2, 3 ja 4 pH säädetään arvoon 7,0.

VI1.2.5 **Testin suorittaminen**

Pulloihin 2, 3 ja 4 (testisuspensiot), 5 (aktiviteettikontrolli) ja 6 (siirrostuksen taustanäyte) lisätään pieni tilavuus siirrosainetta, niin että suspendoituneen kuiva-aineen lopullinen pitoisuus on 30 mg/l. Pulloon 1 ei lisätä siirrosainetta. Pullot asetetaan sekoituslaitteeseen, pullojen ilmatiiviys tarkistetaan, sekoittimet käynnistetään ja hapenkulutuksen mittaus aloitetaan pimeässä. Lämpötila, sekoituslaite ja hapenkulutuksen kulometrinen rekisteröintilaite on tarkistettava päivittäin. Pullojen sisällön mahdolliset värimuutokset on merkittävä muistiin. Kuuden pullon hapenkulutus luetaan suoraan esimerkiksi BOD-käyriä tuottavasta kuusikärkisestä piirturista. Kun inkubaatio on päättynyt (yleensä 28 päivän kuluttua), pullojen sisällön pH-arvot mitataan. Sitten määritetään jäljelle jääneen testattavan kemikaalin ja mahdollisen välituotteen pitoisuus sekä (jos kyseessä on vesiliukoinen aine) DOC-pitoisuus (katso liitettä II.4). Haihtuvien kemikaalien kohdalla on noudatettava erityistä huolellisuutta. Jos nitrifikaatiota on odotettavissa, nitriitti- ja nitraattipitoisuus määritetään mahdollisuuksien mukaan.

VII.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

VII.3.1 **Tulosten käsittely**

Testattavan kemikaalin hapenkulutus (mg) määrätyn ajan kuluttua, korjattuna siirrostuksen taustanäytteen kulutuksella, jaetaan testattavan kemikaalin painolla. Tuloksena saadaan BOD-arvo ilmaistu hapen painona kemikaalin painoa kohti (mg/mg), seuraavan suureyhtälön mukaan:

$$\text{BOD} = \frac{\text{testattavan kemikaalin } O_2 \text{ – kulutus (mg)} - \text{taustanäytten } O_2 \text{ – kulutus (mg)}}{\text{testattavan kemikaalin paino (mg)}}$$

= mg O_2/mg testattavaa kemikaalia

▼B

Prosentuaalinen biohajoavuus lasketaan seuraavan suureyhtälön mukaan:

$$\text{Prosentuaalinen biohajoavuus} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg kemikaalia)}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg kemikaalia)}} \times 100$$

Seosten osalta ThOD lasketaan yksinkertaisten yhdisteiden tapaan alkuaineanalyysin perusteella. Käytettävä ThOD-arvo ($ThOD_{NH4}$ tai $ThOD_{NO3}$) valitaan sen mukaan, esiintyykö nitrifikaatiota vai ei (katso liitettä II.2). Jos nitrifikaatio on vain osittaista, nitrifikaation hapenkulutuksen korjaus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutoksen perusteella (katso liitettä V).

Prosentuaalinen primaarinen biohajoavuus lasketaan spesifisen lähtökemikaalin poistuman perusteella (katso osaa I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Jos pullossa 1 on on havaittu testattavan kemikaalin häviötä fysikaalis-kemiallisen poistuman mittauksen yhteydessä, häviö on raportoitava. Tällöin prosentuaalisen biohajoavuuden laskennassa käytetään pullon 1 testattavan kemikaalin pitoisuutta (S_b) 28 päivän kuluttua.

Jos DOC-määrityksiä (valinnainen toimi) tehdään, lopullinen prosentuaalinen biohajoavuus lasketaan seuraavan suureyhtälön mukaan (katso kohtaa I.7.1):

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

Jos pullossa 1 on havaittu DOC-häviötä fysikaalis-kemiallisen poistuman mittauksen yhteydessä, prosentuaalisen biohajoavuuden laskennassa käytetään tämän pullon DOC-pitoisuutta.

Tulokset kirjataan oheisiin tietolomakkeisiin.

VII.3.2 **Tulosten hyväksyminen**

Siirrostuksen taustanäytteen hapenkulutus on yleensä 20-30 mg O_2/l. Arvo saa olla 28 päivän kuluessa enintään 60 mg/l. Jos arvo on tätä suurempi, tietoja ja koetekniikoita on tarkasteltava erityisen kriittisesti. Jos pH-arvo on alueen 6–8,5 ulkopuolella ja testattavan kemikaalin hapenkulutus on alle 60 %, testattavan kemikaalin pitoisuutta on pienennettävä ja testi on toistettava.

Katso myös kohtaa I.5.2.

Jos aniliinin hapenkulutuksen perusteella laskettu prosentuaalinen hajoaminen ei ylitä 7 päivän kuluessa arvoa 40 % ja 14 päivän kuluessa arvoa 65 %, koe hylätään.

VII.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

VII.4 TIETOLOMAKE

Jäljempänä on esimerkki tietolomakkeesta.

MITI (I) -KOE

1. **LABORATORIO**

2. **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

▼B

3. **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l kemikaalina

Liuoksen alkupitoisuus, C_o: mg/l kemikaalina

Seoksen tilavuus, V: ml

ThOD: mg O_2/l

4. **SIIRROSAINE**

Lietteen näytteenottopaikat:

1) …
2) …
3) …
4) …
5) …
6) …
7) …
8) …
9) …
10) …

Aktiivilietteen suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus, kun aktiivilietettä on akklimatisoitu synteettisellä jätevedellä = … mg/l

Aktiivilietteen tilavuus lopullisen seoksen tilavuutta (litraa) kohti: = … ml

Lietteen pitoisuus lopullisessa seoksessa = … mg/l

5. **HAPENKULUTUS: BIOHAJOAVUUS**

Käytetyn respirometrin tyyppi:

			Aika (päivää)				
			0	7	14	21	28
O_2-kulutus (mg), testattava kemikaali	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2-kulutus (mg), taustanäyte	b						
Korjattu O_2-kulutus (mg)	(a_1-b) (a_2-b) (a_3-b)						
BOD testattavan kemikaalin painoa (mg) kohti	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Pullo 1					
		Pullo 2					
		Pullo 3					
Prosentuaalinen hajoavuus $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		keskiarvo (*)					

(*) Jos toistoarvojen ero on suuri, toistoarvojen keskiarvoa ei pidä käyttää.

▼B

Huomautus: Vertailukemikaalien osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

6. **HIILIANALYYSI** (valinnainen)

Hiilianalysaattori:

Pullo	DOC				DOC-poistuma (%)	Keskiarvo
	Mitattu arvo		Korjattu arvo			
Vesi + testattava aine	a				—	—
Liete + testattava aine	b_1		b_1-c			
Liete + testattava aine	b_2		b_2-c			
Liete + testattava aine	b_3		b_3-c			
Taustanäyte	c		—		—	—

$$\text{Prosentuaalinen DOC} - \text{poistuma} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **SPESIFISEN KEMIKAALIN ANALYYTTISET TIEDOT**

	Testattavan kemikaalin jäännösmäärä kokeen lopussa	Prosentuaalinen hajoaminen
Veteen sekoitettu taustanäyte	S_b	
Siirrostettu näyte	s_{a1}	
	s_{a2}	
	s_{a3}	

$$\text{Prosentuaalinenhajoaminen} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Pullojen a_1, a_2 ja a_3 prosentuaalinen hajoaminen lasketaan vastaavalla tavalla.

8. **HUOMAUTUKSET**

Jos käytettävissä on käyrä, johon on piirretty BOD-arvot ajan funktiona, se on liitettävä raporttiin.

▼B

LIITE I

LYHENTEITÄ JA MÄÄRITELMIÄ

DO: ”Dissolved oxygen” (mg/l) -Vesinäytteeseen liuenneen hapen pitoisuus.

BOD: ”Biochemical oxygen demand” (g) — Happimäärä, jonka pieneliöt kuluttavat testattavan yhdisteen metaboloinnin yhteydessä. BOD ilmaistaan myös hapenkulutuksena (g) testattavan aineen painoa (g) kohti (katso menetelmää C.5).

COD: ”Chemical oxygen demand” (g) — Hapenkulutus, kun testattavaa yhdistettä hapetetaan kuumalla, happamalla dikromaatilla. Suure, joka ilmaisee hapetuskelpoisen aineksen määrän yhdisteessä. COD ilmaistaan myös hapenkulutuksena (g) testattavan aineen massaa (g) kohti (katso menetelmää C.6).

DOC: ”Dissolved organic carbon” — Liuoksessa oleva orgaaninen hiili tai orgaaninen hiili, joka läpäisee 0,45 μm:n suodattimen tai jää pinnalle, kun liuosta on sentrifugoitu nopeudella 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) 15 minuutin ajan.

ThOD: ”Theoretical oxygen demand” (mg) — Happimäärä, joka tarvitaan kemikaalin täydelliseen hapettamiseen. Lasketaan molekyylikaavan avulla (katso liitettä II.2). ThOD ilmaistaan hapenkulutuksena (mg) testattavan aineen massaa kohti (mg).

$ThCO_2$: ”Theoretical carbon dioxide” (mg) — Hiilidioksidimäärä, joka lasketaan saatavan testattavan aineen tunnetusta tai mitatusta, epäorgaaniseen muotoon muunnetusta hiilestä. $ThCO_2$ ilmaistaan myös muodostuneen hiilidioksidin painona (mg) testattavan aineen massaa (mg) kohti.

TOC: ”Total organic carbon” — Näytteen orgaanisen hiilen summa liuoksesta ja supensiosta mitattuna.

IC: ”Inorganic carbon” — Epäorgaaninen hiili.

TC: ”Total carbon” — Näytteen orgaanisen ja epäorgaanisen hiilen summa.

Primaarinen biohajoaminen

Biologisen aktiviteetin aiheuttama aineen kemiallisen rakenteen muuttuminen, jonka seurauksena aine menettää spesifisen ominaisuutensa.

Lopullinen (aerobinen) biohajoaminen

Hajoamisen taso, joka saavutetaan, kun eliöt ovat hyödyntäneet testattavan aineen täysin. Tämän prosessin tuloksena syntyy hiilidioksidia, vettä, epäorgaanisia suoloja ja uutta mikrobista solukkoa (biomassaa).

Helposti biohajoava

Tietyt lopullisen biohajoamisen seulontatestit läpäisseiden kemikaalien yleisluokitus. Kyseiset testit ovat niin tiukkoja, että tällaisten aineiden voidaan katsoa olevan nopeasti ja täydellisesti biohajoavia vedessä ja aerobisissa olosuhteissa.

▼B

Itsestään biohajoava

Kemikaali, jonka tiedetään varmojen todisteiden perusteella olevan primäärisesti tai lopullisesti biohajoava kaikissa tunnetuissa biohajoavuustesteissä.

Käsiteltävyys

Yhdisteiden poistettavuus jätevedestä sen biologisen käsittelyn yhteydessä ilman käsittelyprosessien normaalille toiminnalle koituvia häiriöitä. Helposti biohajoavat yhdisteet ovat yleensä käsiteltäviä, mutta kaikki itsestään biohajoavat yhdisteet eivät. Myös abioottisia prosesseja tapahtuu.

Latenssiaika

Aika, joka kuluu vaimennuskokeessa / die-away –kokeessa siirroshetkestä vähintään 10 %:n hajoamistason saavuttamiseen. Latenssiaika on usein erittäin vaihteleva, ja sen toistettavuus on huono.

Hajoamisaika

Hajoamisaika on latenssiajan päättymistä seuraava, 90 %:n hajoamistason saavuttamiseen kuluva ajanjakso.

10-päiväinen jakso

10 %:n hajoamistason saavuttamista seuraavat 10 päivää.

▼B

LIITE II

SOPIVIEN YHTEENVETOPARAMETRIEN LASKENTA JA MÄÄRITYS

Joissakin menetelmissä tarvitaan määrättyjä yhteenvetoparametreja. Näiden arvojen laskeminen kuvataan jäljempänä. Parametrien käyttö kuvataan yksittäisten menetelmien yhteydessä.

1. **Hiilimäärä**

Hiilimäärä lasketaan tunnetusta alkuainekokoonpanosta tai määritetään testattavan aineen alkuaineanalyysin avulla.

2. **Teoreettinen hapenkulutus (ThOD)**

ThOD-arvo voidaan laskea alkuainekokoonpanosta tai määrittää alkuaineanalyysin avulla. Jos alkuainekokoonpano on esimerkiksi:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

eikä nitrifikaatiota tapahdu, ThOD-arvo voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

Jos tapahtuu nitrifikaatiota, ThOD-arvo voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Kemiallinen hapenkulutus (COD)**

Kemiallinen hapenkulutus (COD) määritetään menetelmän C.6 mukaan.

4. **Liuennut orgaaninen hiili (DOC)**

Määritelmän mukaan liuennut orgaaninen hiili (DOC) on kemikaalin tai seoksen veteen liuennut aines, joka läpäisee 0,45 μm:n suodattimen.

Testiastioista otetaan näytteet, jotka suodatetaan heti kalvosuodatinlaitteessa. Suodoksen ensimmäinen 20 ml:n osuus (jos käytetään pieniä suodattimia, määrä voi olla pienempi) hylätään. Hiilianalyysiä varten käytetään 10–20 ml (tai pienempi määrä, jos näyte annetaan ruiskulla; määrä vaihtelee hiilianalysaattorin mukaan). DOC-pitoisuus määritetään orgaanisella hiilianalysaattorilla, jonka tarkkuuden on oltava riittävä sellaisten pitoisuuksien mittaamiseen, jotka ovat enintään 10 % testin alussa vallinneesta DOC-pitoisuudesta.

Jos suodatettuja näytteitä ei pystytä analysoimaan samana päivänä, niitä voidaan säilyttää 2–4 °C:n lämpötilassa enintään 48 tuntia. Jos säilytysaika on tätä pitempi, näytteitä on säilytettävä - 18 °C:ssa tai tätä alhaisemmassa lämpötilassa.

Huomautuksia:

Hydrofiilisyyden parantamiseksi kalvosuodattimet on usein kyllästetty pinta-aktiivisilla aineilla. Tämän vuoksi suodattimessa voi olla useita milligrammoja liukoista orgaanista hiiltä, mikä voi häiritä biohajoavuusmäärityksiä. Pinta-aktiiviset aineet ja muut liukoiset orgaaniset yhdisteet poistetaan keittämällä suodattimia ionisoimattomassa vedessä tunnin ajan. Käsittely toistetaan kolme kertaa. Keittämisen jälkeen suodattimia voidaan säilyttää vedessä viikon ajan. Jos käytetään kertakäyttösuodattimia, jokainen erä on tarkastettava liukenevan orgaanisen hiilen suhteen.

▼B

Joidenkin kalvosuodatintyyppien kohdalla testattavaa kemikaalia voi kiinnittyä suodattimeen adsorption kautta. Siksi on suositeltavaa varmistaa, että testattava kemikaali ei kiinnity käytettävään suodattimeen.

TOC:n ja DOC:n osuudet näytteessä voidaan määrittää *sentrifugoimalla* (4 000 g: 40 000 ms^{-2}, 15 minuuttia) suodatuksen asemesta. Sentrifugoinnin tuloksiin ei voi luottaa, jos alkuperäinen DOC-pitoisuus on pienempi kuin 10 mg/l, koska tällöin kaikki bakteerit eivät välttämättä poistu tai bakteeriplasman orgaaninen hiili liukenee uudelleen.

VIITTEET

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Publ. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p 65.

— Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs — und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13(1), 169.

▼B

Liite III

HUONOSTI LIUKENEVIEN AINEIDEN BIOHAJOAVUUDEN ARVIOINTI

Huonosti liukenevien aineiden biohajoavuustesteissä on otettava huomioon eräitä erityisseikkoja, jotka kuvataan jäljempänä.

Homogeenisten nesteiden kohdalla ei yleensä ole näytteenotto-ongelmia. Kiinteät aineet sen sijaan on suositeltavaa homogenisoida sopivalla tavalla. Kun tarvitaan muutaman milligramman suuruinen, edustava näyte paljon epäpuhtauksia sisältävästä kemikaaliseoksesta tai aineesta, on noudatettava erityistä tarkkuutta.

Testin aikana voidaan käyttää erilaisia hämmennysmenetelmiä. Hämmennyksen on oltava riittävää pitämään kemikaali dispergoituneena, mutta ei niin voimakasta, että syntyy ylikuumenemista, vaahdonmuodostusta tai tarpeettoman suuria leikkaavia voimia.

Stabiili dispersio voidaan tuottaa myös emulgaattorin avulla. Testiolosuhteissa emulgaattori ei saa olla bakteereille myrkyllinen tai biohajoava, eikä se saa aiheuttaa vaahdonmuodostusta.

Liuottimia koskevat vaatimukset ovat samat kuin emulgaattoreiden kohdalla.

Kiinteitä kantoaineita ei ole suositeltavaa käyttää kiinteiden aineiden testauksessa. Ne voivat kuitenkin sopia öljymäisten aineiden testaukseen.

Kun käytetään apuaineita (emulgaattoreita, liuottimia tai kantoaineita), testiin on sisällytettävä apuainetta sisältävä taustanäyte.

Huonosti liukenevien aineiden biohajoavuusmäärityksissä voidaan käyttää mitä tahansa kolmesta edellä kuvatusta respirometriatestistä (CO_2-, BOD- tai MITI-menetelmää).

VIITTEET

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

Liite 4

BIOHAJOAVUUDEN ARVIOINTI, KUN EPÄILLÄÄN, ETTÄ TESTATTAVA KEMIKAALI ON SIIRROSAINEELLE MYRKYLLINEN

Jos biohajoavuustesti osoittaa, että kemikaali ei ole biohajoava, jäljempänä kuvattavan menetelmän avulla voidaan tarvittaessa määrittää, johtuuko tämä inhibitiosta vai testattavan kemikaalin inerttiydestä (Reynolds et al., 1987).

Myrkyllisyys- ja biohajoavuustesteissä on käytettävä samaa tai samankaltaista siirrosainetta.

Kun kemikaalin biohajoavuutta testataan, kemikaalin myrkyllisyyttä voidaan arvioida käyttämällä aktiivilietteen hengityksenestotestiä (direktiivi 88/302/ETY), BOD-määritystä tai kasvunestomenetelmää yhdessä tai erikseen.

Jos testattavan aineen myrkyllisyyden aiheuttamaa inhibitiota on vältettävä, ehdotetaan, että testattavan aineen pitoisuus pidetään biohajoavuustesteissä enintään kymmenesosana myrkyllisyystestin tuloksena saadusta EC_{50}-arvosta (tai pienempänä kuin EC_{20}-arvo). Yhdisteet, joiden EC_{50}-arvo on suurempi kuin 300 mg/l, eivät todennäköisesti aiheuta myrkyllisyysongelmia hyvää biohajoavuutta testattaessa.

Jos aineen EC_{50}-arvo on pienempi kuin 20 mg/l, testissä on odotettavissa ongelmia. Tällöin testattavaa ainetta on käytettävä pieninä pitoisuuksina, joten suljetun pullon testimenetelmää tai ^{14}C-merkittyjä aineita suositellaan. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää siirrosaineen akklimatisointia, joka mahdollistaa testattavan aineen annostelun suurempina pitoisuuksina kuin edellä mainittuja menetelmiä käytettäessä (tällöin hyvää biohajoavuutta ei kuitenkaan voida määrittää).

VIITTEET

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

▼B

Liite V

NITRIFIKAATION AIHEUTTAMAN HAPENKULUTUKSEN HÄIRIÖN KORJAUS

Kun typpeä sisältämättömän aineen biohajoavuutta arvioidaan hapenkulutuksen avulla, nitrifikaation aiheuttama virhe on marginaalinen (enintään 5 %) siitä huolimatta, että liuoksen ammoniakin typpi hapettuu epäsäännöllisesti testattavaa ainetta ja taustanäytettä sisältävissä astioissa. Jos testattava aine sisältää typpeä, nitrifikaation aiheuttamat virheet voivat olla suuria.

Jos nitrifikaatiota on tapahtunut, mutta vain osittain, reaktioseoksen havaittua hapenkulutusta voidaan korjata sen happimäärän osalta, joka tarvitaan ammoniakin hapettamiseen nitriitiksi ja nitraatiksi. Tämä edellyttää sitä, että inkubaation aikana syntyvät nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutokset määritetään seuraavien suureyhtälöiden avulla:

Yhtälöstä 1 nähdään, että ammoniumkloridin (NH_4Cl:n) typpisisällön (28 g) hapettamiseen nitriitiksi tarvitaan 96 g happea, eli kerroin on 3,43 (96/28).

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Summayhtälö on seuraava

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Yhtälöstä 3 nähdään samoin, että 28 g:n typpimäärän hapettamiseen nitraatiksi tarvitaan 128 g happea, eli kerroin on 4,57 (128/28).

Koska reaktiot tapahtuvat *peräkkäin* ja erilaisten bakteerien vaikutuksesta, nitriittipitoisuus voi vaihdella. Jos se on pieni, nitraattipitoisuus on vastaavasti suurempi. Tällöin nitraatin muodostukseen kuluva happimäärä on 4,57 kerrottuna nitraattipitoisuuden kasvulla ja nitriitinmuodostukseen kuluva happimäärä on 3,43 kerrottuna nitriittipitoisuuden kasvulla. Jos nitriittipitoisuus on pienentynyt, hapenkulutus on - 3,43 kerrottuna pitoisuuden pienenemisellä.

Tästä seuraa, että

nitraatinmuodostuksen kuluttama happimäärä = 4,57 x nitriittipitoisuuden kasvu (4)

ja

nitriitinmuodostuksen kuluttama happimäärä = 3,43 x nitriittipitoisuuden kasvu (5)

ja

nitriittipitoisuuden pienenemisen myötä hävinnyt happimäärä = - 3,43 x nitraattipitoisuuden pieneneminen, (6)

joten

nitrifikaation aiheuttama hapenkulutus = ± 3,43 x nitriittipitoisuuden muutos + 4,57 x nitraattipitoisuuden kasvu, (7)

mistä seuraa, että

hiilen hapettumiseen kuluva happimäärä = havaittu yhteiskulutus — nitrifikaatioon kuluva happimäärä. (8)

Jos vain hapettuneen typen kokonaismäärä määritetään, voidaan olettaa, että nitrifikaation edellyttämä hapenkulutus on suunnilleen 4,57 x hapettuneen typen kasvu.

Tämän jälkeen hiilen hapettumisen edellyttämää, korjattua happimäärää verrataan ThOD NH_3 -arvoon (katso liitettä II).

▼B

C.5 HAJOAMINEN — BIOKEMIALLINEN HAPENKULUTUS

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä mitataan kiinteiden tai nestemäisten orgaanisten aineiden biokemiallista hapenkulutusta (BOD).

Testin tiedot koskevat vesiliukoisia aineita, mutta testillä voidaan — ainakin periaatteessa — testata myös haihtuvia ja huonosti veteen liukenevia aineita.

Menetelmää voidaan soveltaa vain sellaisiin orgaanisiin aineisiin, jotka eivät estä bakteerien toimintaa testipitoisuutta käytettäessä. Jos testattava aine ei liukene testipitoisuutta käytettäessä, aineen riittävä dispersio voidaan varmistaa erikoismenetelmien (esimerkiksi ultraäänidispersion) avulla.

Jos tulokseksi saadaan pieniä arvoja, tulosten tulkinnassa ja testipitoisuuksien valinnassa voidaan käyttää kemikaalien myrkyllisyystietoja.

1.2 YKSIKÖT JA MÄÄRITELMÄT

Määritelmän mukaan BOD on liuenneen hapen massa, joka tarvitaan testattavan aineen annetun liuostilavuuden biokemialliseen hapettamiseen annetuissa olosuhteissa.

Tulokset ilmaistaan BOD-massana (g) testattavan aineen massaa (g) kohti.

1.3 VERTAILUAINEET

Sopivan vertailuaineen käyttöä siirrosaineen aktiviteetin tarkistamiseksi suositellaan.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tunnettuun määrään ainetta, joka on liuotettu tai dispergoitu hyvin ilmastettuun, sopivaan liuokseen, siirrostetaan mikroeliöitä, ja siirrostettua liuosta inkuboidaan pimeässä ja vakiolämpötilassa.

BOD-arvo määritetään liuenneen hapen alku- ja loppupitoisuuden perusteella. Testin kesto on 5–28 päivää.

Rinnan testiliuoksen kanssa on käytettävä taustaliuosta, jossa ei ole testattavaa ainetta.

1.5 LAATUKRITEERIT

BOD-määritystä ei hyväksytä aineen biohajoavuuden määrityksenä. BOD-määritystä voidaan käyttää vain seulontatestinä.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

Aineesta valmistetaan alustava liuos tai dispersio, jonka BOD-pitoisuus on sopiva testimenetelmää varten. Liuoksen tai dispersion BOD-arvo määritetään sopivan kansallisen tai kansainvälisen standardisoidun menetelmän avulla.

▼B

2. **TIEDOT JA ARVIOINTI**

Alustavan liuoksen BOD-arvo lasketaan valitun menetelmän mukaan, ja tulos muunnetaan BOD-massaksi (g) testattavan aineen massaa (g) kohti.

3. **RAPORTOINTI**

Käytetty menetelmä ilmoitetaan.

Ilmoitettavan biokemiallisen hapenkulutuksen arvon on oltava vähintään kolmen hyväksyttävän mittauksen keskiarvo.

Kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, on ilmoitettava. Tämä koskee erityisesti epäpuhtauksia, aineen fysikaalista olomuotoa, myrkyllisyyttä ja muita aineen ominaisuuksia, jotka voivat vaikuttaa tuloksiin.

Jos apuainetta on käytetty biologisen nitrifikaation estämiseksi, tämä on raportoitava.

4. VIITTEET

Seuraavassa on esimerkkejä standardisoiduista menetelmistä:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6 **HAJOAMINEN — KEMIALLINEN HAPENKULUTUS**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Menetelmällä mitataan kiinteiden ja nestemäisten aineiden kemiallista hapenkulutusta (COD) valvotuissa laboratorio-olosuhteissa haluttua standardisoitua menettelyä noudattaen.

Testattavan aineen kemiallisen kaavan tunteminen (onko aine halogeenisuola, orgaanisen aineen ferrisuola, orgaaninen klooriyhdiste tms.) helpottaa testin suorittamista ja tulosten tulkintaa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Kemiallinen hapenkulutus on aineen hapetettavuuden mitta. Aineen kemiallinen hapenkulutus ilmaistaan hapetusaineen kulutusta vastaavana happimääränä, kun ainetta hapetetaan valvotuissa laboratorio-olosuhteissa.

Kemiallinen hapenkulutus ilmaistaan COD-massana (g) testattavan aineen massaa (g) kohti.

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tunnettua määrää veteen liuotettua tai dispergoitua ainetta hapetetaan kaliumdikromaatilla väkevässä rikkihapossa vastavirtaperiaatteen mukaan kahden tunnin ajan. Katalysaattorina käytetään hopeasulfaattia. Dikromaattijäännös määritetään standardisoidulla ferriammoniumsulfaatilla titraamalla.

Jos testattava aine sisältää klooria, liuokseen lisätään elohopeasulfaattia (*) kloridin aiheuttaman häiriön vähentämiseksi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Koska COD-arvon määritysmenetelmä on tulkinnanvarainen,

COD-arvo on ”hapetettavuusindikaattori” ja sellaisenaan käytännöllinen tapa mitata orgaanista ainetta.

Jotkin rengasyhdisteet ja monet haihtuvat aineet (esimerkiksi lyhytketjuiset rasvahapot) eivät hapetu tässä testissä täysin.

1.6 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Valmistetaan aineen alustava liuos tai dispersio siten, että tuloksena saatava COD-arvo on 250–600 mg/l.

(*) Elohopeasuoloja sisältävät liuokset on käytön jälkeen käsiteltävä siten, ettei ympäristöön pääse elohopeaa.

▼B

Huomautuksia:

Jos aine on huonosti liukenevaa tai dispergoitumatonta, testilaitteeseen voidaan panna veteen sekoitettuna hienoksi jauhettua tai nestemäistä ainetta, joka vastaa määrältään noin 5 mg:aa COD:tä.

Kemiallinen hapenkulutus (COD) voidaan usein — etenkin huonosti liukenevien aineiden kohdalla — määrittää käyttäen menetelmän muunnosta, joka perustuu paineentasaajalla varustettuun suljettuun järjestelmään (H. Kelkenberg, 1975). Muunnoksen avulla voidaan usein tehdä menestyksekkäästi kvantitatiivinen määritys aineista (esimerkiksi etikkahaposta), joiden määrittäminen perinteisellä menetelmällä on vaikeaa. Menetelmää ei kuitenkaan voida soveltaa pyridiiniin. Kaliumdikromaattipitoisuuden (katso viitettä 1) nostaminen arvoon 0,25 N (0,0416 M) mahdollistaa testattavan aineen suorapunnituksen 5–10 mg:n annoksena, mikä on tärkeää huonosti veteen liukenevien aineiden COD-määrityksessä (katso viitettä 2).

Muussa tapauksessa COD-arvo määritetään sopivan kansallisen tai kansainvälisen standardisoidun menetelmän avulla.

2. TIEDOT JA ARVIOINTI

Testipullojen sisällön COD lasketaan valitun normalisoidun menetelmän mukaan ja muunnetaan COD-massaksi (g) testatun aineen massaa (g) kohti.

3. RAPORTOINTI

Raportissa on oltava maininta käytetystä vertailumenetelmästä.

Ilmoitetun kemiallisen hapenkulutuksen arvon on oltava vähintään kolmen mittauksen keskiarvo. Kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, on ilmoitettava. Tämä koskee erityisesti epäpuhtauksia, aineen fysikaalista olomuotoa, myrkyllisyyttä tai aineen muita tunnettuja ominaisuuksia, jotka voivat vaikuttaa tuloksiin.

Jos kloridin häiritsevä vaikutus on pyritty minimoimaan elohopeasulfaatilla, tämä on raportoitava.

4. VIITTEET

1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphcre, 1984, vol. 13, 169.

Seuraavassa on esimerkkejä normalisoiduista menetelmistä.

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NFN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. **HAJOAMINEN — ABIOOTTINEN HAJOAMINEN: HYDROLYYSI PH:N FUNKTIONA**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro TG 111 (2004).

1.1 JOHDANTO

Kemikaalit voivat päästä pintavesiin esimerkiksi suoraan laskettuina, lentosumutuksen yhteydessä, valumana sekä viemäröinnin, jätteiden käsittelyn, teollisuuden, kotitalouden tai maanviljelyn päästöinä ja ilmakehän laskeumina. Ne voivat sen jälkeen hajota vesissä kemiallisten (esim. hydrolyysi ja hapettuminen), valokemiallisten ja/tai mikrobiprosessien kautta. Tässä testiohjeessa kuvataan laboratoriotestimenetelmä, jolla voidaan arvioida kemikaalien abioottinen hydrolyyttinen hajoaminen vesiympäristössä pH-arvoilla, jotka siellä tavallisesti vallitsevat (pH 4–9). Menetelmä perustuu jo olemassa oleviin testiohjeisiin (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Kokeissa määritetään i) testiaineen hydrolyysinopeus pH:n funktiona ja ii) hydrolyysituotteet, joille organismit voivat altistua, sekä niiden muodostumis- ja hajoamisnopeudet. Tällaisia tutkimuksia voivat edellyttää kemikaalit, jotka annostellaan suoraan veteen tai jotka päätyvät ympäristöön edellä mainittujen muiden reittien kautta.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Katso liite 2.

1.3 MENETELMÄN SOVELTAMISALA

Testi soveltuu kemiallisille aineille (merkityille tai merkitsemättömille), joille on olemassa analyysimenetelmä, jota voidaan soveltaa riittävällä tarkkuudella ja herkkyydellä. Tässä kuvattua menetelmää voidaan soveltaa lievästi haihtuviin ja haihtumattomiin yhdisteisiin, jotka ovat riittävän vesiliukoisia. Menetelmää ei voida soveltaa kemikaaleihin, jotka haihtuvat helposti vedestä (esim. savuavat aineet tai orgaaniset liuottimet) ja jotka eivät siis säily liuoksessa tässä kuvatuissa testiolosuhteissa. Testiä voi olla vaikea toteuttaa aineilla, joiden vesiliukoisuus on hyvin vähäinen (8).

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiaine lisätään steriileihin vesipohjaisiin puskuriliuoksiin, joilla on eri pH-arvot (pH 4, 7 ja 9). Liuoksia inkuboidaan sitten pimeässä valvotuissa laboratorio-olosuhteissa (vakiolämpötiloissa). Puskuriliuoksissa oleva testiaine ja hydrolyysituotteet analysoidaan sopivin väliajoin. Kun testiaine on merkitty jollain merkkiaineella (esim. ^{14}C), massatase voidaan määrittää helpommin.

Testimenetelmä on suunniteltu monivaiheiseksi liitteessä 1 kuvatulla tavalla. Kukin vaihe riippuu edellisen vaiheen tuloksista.

▼B

1.5 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Hydrolyysinopeuden mittaamiseen voidaan käyttää merkittyä tai merkitsemätöntä testiainetta. Merkittyä testiainetta suositellaan yleensä hydrolyysireittien tutkimiseen ja massataseen määrittämiseen. On kuitenkin tapauksia, joissa merkkiaineen käyttö ei ole ehdottoman välttämätöntä. ^{14}C on suositeltava leima, mutta muitakin isotooppeja, kuten ^{13}C, ^{15}N tai ^{3}H, voidaan käyttää. Leiman pitäisi mahdollisuuksien mukaan sijaita molekyylin stabiileimmassa osassa tai osissa. Jos testiainemolekyyli sisältää esimerkiksi yhden renkaan, tämä rengas täytyy merkitä. Jos testiaine sisältää kaksi tai useampia renkaita, saatetaan tarvita erillinen testi kunkin merkityn renkaan reitin arvioimiseksi ja tarvittavan tiedon saamiseksi hydrolyysituotteiden muodostumisesta. Testiaineen puhtausasteen tulisi olla vähintään 95 %.

Ennen hydrolyysitestin tekemistä testiaineesta on oltava saatavilla seuraavat tiedot:

(a) vesiliukoisuus [testimenetelmä A.6];

(b) liukoisuus orgaanisiin liuottimiin;

(c) höyrynpaine [testimenetelmä A.4] ja/tai Henryn lain vakio;

(d) n-oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin [testimenetelmä A. 8];

(e) dissosiaatiovakio (pK_a) [OECD:n testiohje 112] (9);

(f) suoran ja epäsuoran valokemiallisen muuntumisen nopeus vedessä (valoherkän aineen ollessa kyseessä).

Käytettävissä on oltava analyysimenetelmät testiaineen kvantifioimiseksi sekä tarvittaessa hydrolyysituotteiden tunnistamiseksi ja kvantifioimiseksi vesiliuoksista (katso myös kohta 1.7.2).

1.6 VERTAILUAINEET

Mikäli mahdollista, hydrolyysituotteiden tunnistukseen ja kvantifiointiin on käytettävä vertailuaineita. Menetelminä käytetään spektroskopiaa ja kromatografiaa tai muita menetelmiä, joiden herkkyys on sopiva.

1.7 LAATUVAATIMUKSET

1.7.1 **Saanto**

Vähintään kahden puskuriliuoksen tai niiden uutteiden analysointi heti testiaineen lisäämisen jälkeen antaa alustavia tietoja analyysimenetelmän toistettavuudesta ja testiaineen lisäämismenetelmän tasaisuudesta. Saanto testin myöhemmissä vaiheissa määritetään vastaavan massataseen mukaan (kun käytetään merkittyä ainetta). Saantojen tulisi olla 90–110 % sekä merkittyä että merkitsemätöntä ainetta käytettäessä (7). Jos tätä on teknisesti vaikea saavuttaa, merkitsemättömien aineiden osalta hyväksytään 70 prosentin saanto, mutta tämä on perusteltava.

▼B

1.7.2 **Analyysimenetelmän toistettavuus ja herkkyys**

Testiaineen ja hydrolyysituotteiden myöhempään kvantifiointiin käytettävän analyysimenetelmän tai -menetelmien toistettavuus voidaan tarkistaa kaksoismäärittämällä samat puskuriliuokset (tai niiden uutteet) sen jälkeen, kun on muodostunut riittävästi hydrolyysituotteita kvantifioitavaksi.

Analyysimenetelmän on oltava riittävän herkkä, jotta sen avulla voidaan kvantifioida testiaineen pitoisuudet, jotka ovat 10 % alkuperäisestä pitoisuudesta tai tätä vähemmän. Tarvittaessa analyysimenetelmien pitäisi olla myös riittävän herkkiä, jotta niiden avulla voidaan (milloin tahansa tutkimuksen aikana) kvantifioida hydrolyysituotteet, jotka ovat 10 prosenttia tai enemmän annostellusta testiaineesta, ja kvantifioinnin on oltava mahdollista pitoisuuksissa, jotka ovat 25 % suurimmasta pitoisuudesta tai tätä vähemmän.

1.7.3 **Hydrolyysin kineettisten mittaustietojen luottamusvälit**

Luottamusvälit on laskettava ja esitettävä kaikille regressiokertoimille, nopeusvakioille, puoliintumisajoille ja mahdollisille muille kineettisille parametreille (esim. DT50).

1.8 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.8.1 **Laitteet**

Testi on suoritettava lasiastioissa (esimerkiksi koeputkissa tai pulloissa), tarvittaessa pimeässä ja steriileissä olosuhteissa, paitsi jos esitiedot (kuten n-oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin) osoittavat, että testiaine saattaa kiinnittyä lasiin. Tällöin voidaan harkita jonkin muun materiaalin, esimerkiksi teflonin, käyttöä. Jos testiaineen tiedetään kiinnittyvän lasiin, ongelmaa voidaan helpottaa myös yhdellä tai useammilla seuraavista tavoista:

— Määritetään testiastiaan kiinnittyneen testiaineen ja hydrolyysituotteiden massa.

— Käytetään ultraäänihaudetta.

— Pestään kaikki lasitavarat liuottimella kunkin näytteenottokerran jälkeen.

— Käytetään kaupallisia valmisteita.

— Lisätään testiaine järjestelmään lisäliuottimen avulla; tällöin lisäliuottimen on oltava aine, joka ei hydrolysoi testiainetta.

Yleensä vaatimuksena on, että eri testiliuosten inkubointiin käytetään lämpötilakontrolloituja vesihauderavistimia tai termostaattisesti ohjattuja inkubaattoreita.

Testissä tarvitaan tavanomaisia laboratoriolaitteita, erityisesti seuraavia:

— pH-mittari,

▼B

— analyyttiset laitteet, kuten GC-, HPLC- ja TLC-laitteet, mukaan luettuina radioaktiivisten tai muiden kuin radioaktiivisten merkkiaineiden osoittamiseen soveltuvat järjestelmät tai käänteinen isotooppilaimennusmenetelmä,

— tunnistukseen käytettävät laitteet (esimerkiksi MS-, GC-MS-, HPLC-MS-spektrometri tai NMR-laite),

— nestetuikelaskin,

— erotussuppilot neste-neste-uuttoa varten,

— liuosten ja uutteiden konsentrointivälineet (esimerkiksi pyörähaihdutin),

— lämpötilakontrolloitu laite (esim. vesihaude).

Esimerkiksi seuraavia kemiallisia reagensseja tarvitaan:

— orgaaniset liuottimet (analyysilaatu), kuten heksaani tai dikloorimetaani,

— tuikeneste,

— puskuriliuokset (tiedot kohdassa 1.8.3).

Kaikki hydrolyysitesteissä käytettävät lasiastiat, vesi (reagenssilaatu) ja puskuriliuokset on steriloitava.

1.8.2 **Testiaineen annostelu**

Testiaine annostellaan vesiliuoksena eri puskuriliuoksiin (katso liite 3). Jos riittävä liukeneminen sitä edellyttää, testiaineen annostelussa voidaan käyttää pieniä määriä veteen sekoittuvia liuottimia (esimerkiksi asetonitriiliä, asetonia tai etanolia), mutta niiden määrä ei saa yleensä olla enempää kuin 1 tilavuusprosentti. Mikäli liuottimia aiotaan käyttää suurempina pitoisuuksina (esim. kun on kyse huonoliukoisista testiaineista), tämä sallitaan vain, jos voidaan osoittaa, että liuottimella ei ole vaikutusta testiaineiden hydrolyysiin.

Kaupallisten valmisteiden käyttö testissä ei ole yleensä suositeltavaa, koska ei voida sulkea pois sitä mahdollisuutta, että valmisteen ainesosat voivat vaikuttaa hydrolyysiprosessiin. Mikäli on kuitenkin kyse huonosti vesiliukoisista aineista tai lasiin kiinnittyvistä aineista (katso kohta 1.8.1), kaupallisten valmisteiden käyttö voi olla sopiva vaihtoehto.

Testiainetta saisi käyttää vain yhdessä pitoisuudessa, joka ei saisi olla yli 0,01 M tai yli puolet kyllästymispitoisuudesta (katso liite 1).

▼B

1.8.3 **Puskuriliuokset**

Hydrolyysitesti olisi toteutettava pH-arvoilla 4, 7 ja 9. Tätä varten puskuriliuokset olisi valmistettava käyttäen reagenssilaadun kemikaaleja ja vettä. Joitain sopivia puskurijärjestelmiä esitellään liitteessä 3. On huomattava, että puskurijärjestelmä voi vaikuttaa hydrolyysin nopeuteen. Jos tällainen vaikutus havaitaan, olisi käytettävä jotain muuta puskurijärjestelmää1 ([1]).

Kunkin puskuriliuoksen pH olisi tarkistettava kalibroidulla pH-mittarilla vähintään pH-yksikön kymmenesosan tarkkuudella ja vaaditussa lämpötilassa.

1.8.4 **Koeolosuhteet**

1.8.4.1 *Testilämpötila*

Hydrolyysikokeet on suoritettava vakioiduissa lämpötiloissa. Ekstrapolointitarkoituksia varten on tärkeää, että lämpötilaa ylläpidetään vähintään tarkkuudella 0,5 °C.

Alustava testi (vaihe 1) olisi suoritettava lämpötilassa 50 °C, jos testiaineen hydrolyyttinen käyttäytyminen on tuntematon. Seuraavan vaiheen kineettiset testit olisi suoritettava vähintään kolmessa lämpötilassa (mukaan lukien 50 °C:ssa suoritettava testi), ellei vaiheen 1 testissä todettu, että testiaine on hydrolyyttisesti stabiili. Suositeltava lämpötila-alue on 10–70 °C (mielellään siten, että ainakin yksi käytetty lämpötila on alle 25 °C). Tämä lämpötila-alue kattaa raportointilämpötilan 25 °C ja useimmat kentällä vallitsevat lämpötilat.

1.8.4.2 *Valo ja happi*

Kaikki hydrolyysitestit on suoritettava käyttäen sopivaa menetelmää, jolla vältetään fotolyyttiset vaikutukset. Happi pitäisi pyrkiä poistamaan kaikin sopivin tavoin (esim. poreiluttamalla heliumia, typpeä tai argonia viiden minuutin ajan ennen liuoksen valmistamista).

1.8.4.3 *Testin kesto*

Alustavan testin kesto on viisi päivää, ja myöhempien vaiheiden testejä tulisi jatkaa, kunnes 90 % testiaineesta on hydrolysoitunut, tai 30 päivän ajan sen mukaan, kumpi on varhaisempi.

1.8.5 **Testin suorittaminen**

1.8.5.1 *Alustava testi (vaihe 1)*

Alustava testi suoritetaan lämpötilassa 50 ± 0,5 °C ja pH-arvoilla 4,0, 7,0 ja 9,0. Jos viiden päivän jälkeen havaittu hydrolyysi on vähemmän kuin 10 % ($t^{0,5}$25 °C > 1 vuosi), testiaine katsotaan hydrolyyttisesti stabiiliksi ja lisätestausta ei yleensä tarvita. Jos aineen tiedetään olevan epästabiili sellaisissa ympäristön lämpötiloissa ([2]), joissa aine esiintyy, alustavaa testiä ei vaadita. Analyysimenetelmän on oltava riittävän tarkka ja herkkä, jotta sillä voidaan havaita 10 prosentin vähennys alkuperäisestä pitoisuudesta.

([1]) Mabey ja Mill suosittelevat boraatti- tai asetaattipuskurin käyttöä fosfaattipuskurin sijaan (11).

([2]) Tällainen tieto voi olla peräisin muista lähteistä, kuten rakenteellisesti samankaltaisten yhdisteiden hydrolyysitiedoista (kirjallisuudesta) tai muista alustavista semikvantitatiivisista hydrolyysitesteistä, joissa testiainetta on testattu aiemmassa kehitysvaiheessa.

▼B

1.8.5.2 *Epästabiilien aineiden hydrolyysi (vaihe 2)*

Seuraavan vaiheen testi suoritetaan niillä pH-arvoilla, joilla testiaine todettiin epästabiiliksi alustavassa testissä. Testiaineen puskuriliuosten lämpötila säädetään valittuihin lämpötiloihin termostaatin avulla. Ensimmäisen kertaluvun reaktioiden testaamiseksi kukin reaktioliuos analysoidaan sellaisin aikavälein, että saadaan ainakin kuusi datapistettä, yleensä alueella, joka vastaa 10–90 prosentin hydrolyysiä. Yksittäiset rinnakkaiset testinäytteet (vähintään kaksi rinnakkaista näytettä erillisissä reaktioastioissa) otetaan ja niiden sisältö analysoidaan kussakin vähintään kuudesta näytteenottoajankohdasta (ts. vähintään kaksitoista kaksoismääritettyä datapistettä). Ei riitä, että käytetään yhtä ainoaa näytettä, josta otetaan yhtä suuret määrät testiliuosta kunakin näytteenottoajankohtana, koska tämä ei mahdollista vaihtelukertoimen määritystä ja voi johtaa ongelmiin testiliuoksen kontaminoitumisen vuoksi. Tämän vaiheen lopussa (ts. kun hydrolyysi on 90-prosenttinen tai 30 päivän jälkeen) on suoritettava testi steriiliyden vahvistamiseksi. Jos hajoamista ei havaita, steriiliystestiä ei katsota tarpeelliseksi.

1.8.5.3 *Hydrolyysituotteiden tunnistaminen (vaihe 3)*

Hydrolyysituotteet ja ainakin sellaiset, jotka edustavat > 10 %:a annostellusta määrästä, on tunnistettava sopivilla analyysimenetelmillä.

1.8.5.4 *Vapaaehtoiset lisätestit*

Hydrolyyttisesti epästabiili testiaine voi edellyttää lisätestejä myös muilla pH-arvoilla kuin 4, 7 ja 9. Esimerkiksi fysiologisia tarkoituksia varten voidaan tarvita happamampien olosuhteiden testi (esim. pH 1,2), jossa käytetään yhtä ainoaa fysiologisesti relevanttia lämpötilaa (37 °C).

2. **TULOKSET**

Testiaineen ja hydrolyysituotteiden määrät annetaan prosentteina annostellusta lähtöpitoisuudesta ja tarvittaessa yksikkönä mg/l kunkin näytteenottovälin osalta ja kunkin pH-arvon ja testilämpötilan osalta. Lisäksi massatase pitäisi antaa prosentteina annostellusta lähtöpitoisuudesta, jos on käytetty leimattua testiainetta.

Testiaineen pitoisuuksista ajan funktiona olisi annettava graafinen esitys logaritmiasteikolla. Mahdolliset hydrolyysituotteet ja ainakin sellaiset, jotka edustavat ≥ 10 %:a annostellusta määrästä, on tunnistettava ja niiden pitoisuuksia koskevat tiedot esitettävä samalla tavalla graafisesti logaritmiasteikolla kuin alkutuotteen osalta siten, että niiden muodostumis- ja hajoamisnopeudet voidaan määrittää.

▼B

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Puoliintumisajat tai DT_{50}-arvot on määriteltävä tarkemmin sopivalla kinetiikkamalliin perustuvalla laskutavalla. Puoliintumisaikojen arvot ja/tai DT_{50}-arvot (mukaan luettuina luottamusvälit) on ilmoitettava kunkin pH-arvon ja lämpötilan osalta. Samalla on ilmoitettava käytetty malli, kinetiikan kertaluku ja determinaatiokerroin (r^2). Tarvittaessa laskelmat on tehtävä myös hydrolyysituotteista.

Suoritettaessa nopeustutkimuksia eri lämpötiloissa pseudo-ensimmäisen kertaluvun hydrolyysireaktion nopeusvakiot ($k_{obs} = k_{hav}$) pitäisi esittää lämpötilan funktiona. Laskemisen täytyisi pohjautua sekä hydrolyysityypeittäin (happokatalysoitu, neutraali tai emäskatalysoitu) eriteltyihin havaittuihin nopeusvakioihin (vastaavasti k_H, $k_{neutraali}$ tai k_{OH}) että Arrheniuksen yhtälöön:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i=H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

jossa A_i ja B_i ovat regressiovakioita parhaiten sopivien suorien vastaavasta leikkauskohdasta ja kulmakertoimesta. Vakiot on saatu lineaarisella regressiolla kuvaajasta ln (k_i) vs. 1/T. Soveltamalla Arrheniuksen yhtälöä hapon katalysoimaan, neutraaliin tai emäksen katalysoimaan hydrolyysiin voidaan pseudo-ensimmäisen kertaluvun hydrolyysin nopeusvakiot ja siten myös puoliintumisajat laskea muille lämpötiloille, joille ei ole mahdollista toteuttaa suoraa, kokeellista nopeusvakion määrittämistä (10).

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Useimpien hydrolyysireaktioiden reaktionopeus on lähellä ensimmäisen kertaluvun reaktion nopeutta, joten puoliintumisajat riippuvat pitoisuudesta (katso yhtälö 4 liitteessä 2). Tämä merkitsee sitä, että välillä 10^{-2}-10^{-3} määritetyt laboratoriotulokset ovat siirrettävissä ympäristöolosuhteisiin ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey ja Mill (11) mainitsevat useita esimerkkejä puhtaassa vedessä ja luonnonvesissä mitattujen hydrolyysinopeuksien hyvästä keskinäisestä vastaavuudesta useiden kemikaalien osalta, edellyttäen että sekä pH että lämpötila oli mitattu.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava (josta käy ilmi leiman sijainti käytettäessä radioaktiivista merkkiainetta) ja merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet (katso kohta 1.5),

— testiaineen puhtaus (epäpuhtaudet),

— merkkiaineella leimatun kemikaalin leiman puhtaus ja molaarinen aktiivisuus tapauksen mukaan.

▼B

— Puskuriliuokset:

— valmistusajankohdat ja –tiedot,

— käytetyt puskurit ja vedet,

— puskuriliuosten molaarisuus ja pH.

Testiolosuhteet:

— testien suorituspäivämäärät,

— testiaineen annosteltu määrä,

— testiaineen annostelutapa ja annostelussa käytetyt liuottimet (tyyppi ja määrä),

— testiaineen sisältävien puskuriliuosten inkuboinnissa käytetty volyymi,

— kuvaus käytetystä inkubointijärjestelmästä,

— pH ja lämpötila testin aikana,

— näytteenottoajankohdat,

— erotusmenetelmä(t),

— menetelmät testiaineen ja hydrolyysituotteiden kvantifioimiseksi ja tunnistamiseksi puskuriliuoksista,

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

Tulokset:

— käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus ja herkkyys,

— saannot (kohdassa 1.7.1 annetaan validissa testissä saavutettavat prosenttiarvot),

— rinnakkaisnäytteiden mittaustulokset ja keskiarvot taulukkomuodossa,

— massatase testien aikana ja niiden lopuksi (kun käytetään merkkiainetta),

— alustavan testin tulokset,

— tulosten pohdinta ja tulkinta,

— kaikki alkuperäiset mittaustulokset ja luvut.

Seuraavat tiedot tarvitaan vain, kun määritetään hydrolyysinopeus:

— graafiset esitykset testiaineiden ja tarvittaessa hydrolyysituotteiden pitoisuuksista ajan funktiona ja kussakin pH-arvossa ja lämpötilassa,

— Arrheniuksen yhtälöstä saadut tulokset lämpötilalle 20 °C/25 °C, mukana pH, nopeusvakio [h^{-1} tai $päivä^{-1}$], puoliintumisaika tai DT_{50}, lämpötilat [°C] (mukaan luettuina luottamusvälit) sekä korrelaatiokertoimet (r^2) tai vastaavat tiedot,

— ehdotettu hydrolyysireitti.

▼B

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltensvon Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 — 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

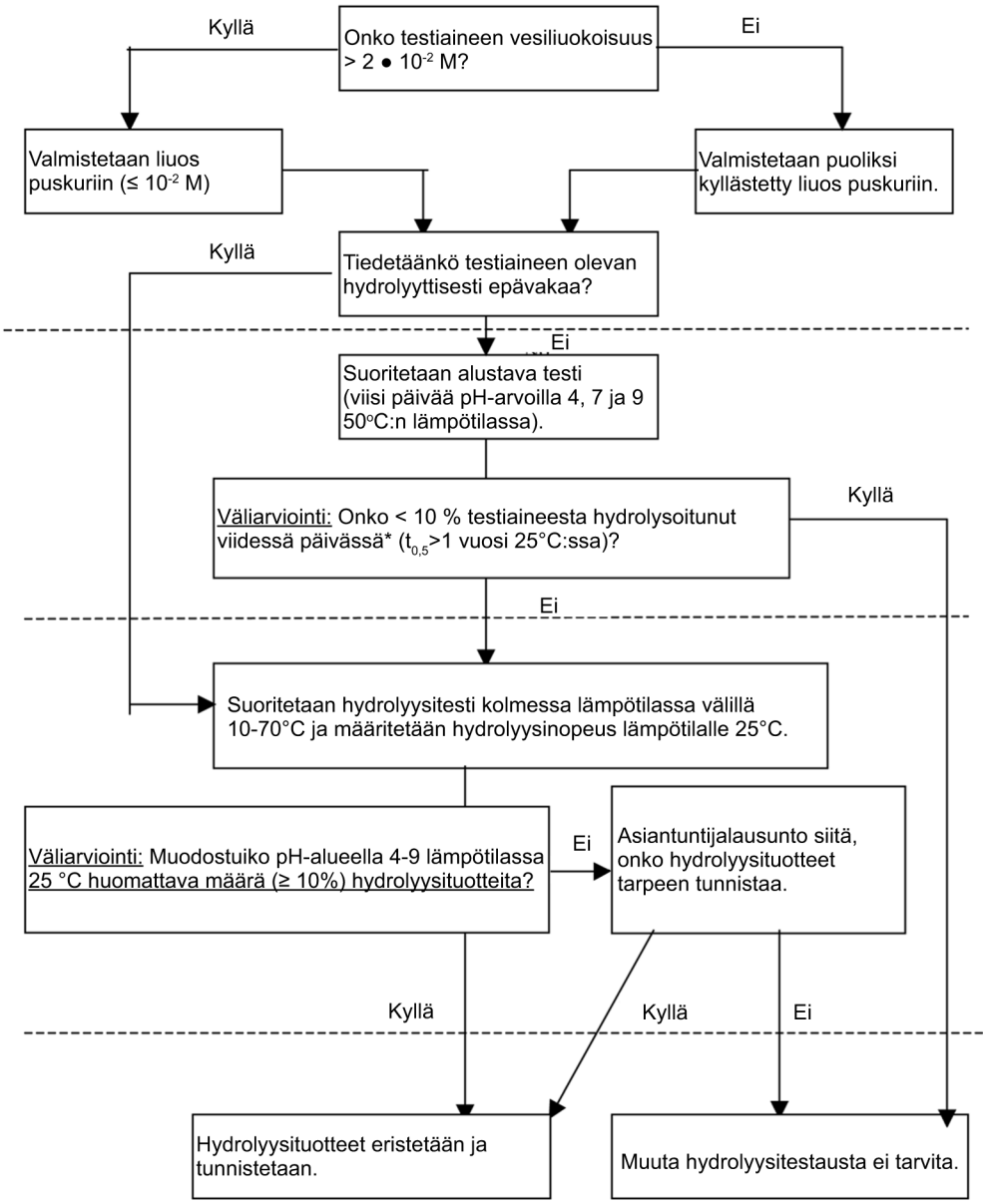
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383–415.

▼B

Liite 1

Vaiheittainen hydrolyysitestimalli



* Jos 10 % testiaineesta hydrolysoituu 50 °C:ssa, vastaa se noin 30 päivän puoliintumisaikaa, mikä vastaa noin arvoa 1 vuosi 25°C:ssa.

▼B

Liite 2

Määritelmät ja yksiköt

Kaikissa tapauksissa on käytettävä **kansainvälisen SI-standardin mukaisia yksikköjä.**

Testiaine: mikä tahansa aine, joko lähtöaine tai merkitykselliset hajoamistuotteet.

Muuntumistuotteet: kaikki aineet, jotka syntyvät testiaineen bioottisista tai abioottisista muuntumisreaktioista.

Hydrolyysituotteet: kaikki aineet, jotka syntyvät testiaineen hydrolyyttisistä muuntumisreaktioista.

Hydrolyysi: testiaineen RX reaktio veden kanssa sillä lopputuloksella, että ryhmä X vaihtuu OH:n kanssa reaktiokeskuksessa.

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Tässä yksinkertaistetussa prosessissa nopeus, jolla RX:n pitoisuus vähenee, on seuraavien kaavojen mukainen:

nopeus = $k\ [H_2O]\ [RX]$ toisen kertaluvun reaktio

tai

nopeus = $k\ [RX]$ ensimmäisen kertaluvun reaktio

riippuen reaktionopeutta määräävästä vaiheesta. Koska vettä on paljon enemmän kuin testiainetta, tämäntyyppinen reaktio kuvataan yleensä pseudo-ensimmäisen kertaluvun reaktiona, jossa havaittu nopeusvakio on

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

ja reaktionopeus voidaan määrittää lausekkeesta (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

jossa

t = aika

ja C_o, C_t = RX:n pitoisuudet ajankohdissa 0 ja t.

Tämän vakion yksiköiden dimensio on $(\text{aika})^{-1}$, ja reaktion puoliintumisaika (aika, jossa 50 % RX:stä on reagoinut) on

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Puoliintumisaika: ($t_{0,5}$) on aika, joka kuluu testiaineen 50-prosenttiseen hydrolyysiin tapauksissa, joissa hajoaminen voidaan kuvata ensimmäisen kertaluvun kinetiikan avulla; se ei riipu pitoisuudesta.

(*) Jos mittaustulosten esitys logaritmisessa asteikossa ajan funktiona ei osoita lineaarista funktiota (joka vastaa ensimmäisen kertaluvun reaktionopeutta), yhtälöä [3] ei voida käyttää testiyhdisteen hydrolyysivakion määrittämiseen.

▼B

DT_{50} (häviämisaika 50): aika, jonka kuluessa testiaineen pitoisuus vähenee 50 %:lla; se eroaa puoliintumisajasta $t_{0,5}$, kun reaktio ei ole ensimmäisen kertaluvun kinetiikan reaktio.

k:n arvioiminen eri lämpötiloissa

Kun nopeusvakiot tiedetään kahdessa lämpötilassa, nopeusvakiot voidaan laskea muiden lämpötilojen osalta käyttämällä Arrheniuksen yhtälöä:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ or } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Kun ln k esitetään graafisesti 1/T:n funktiona, saadaan suora viiva, jonka kulmakerroin on -E/R.

Tällöin:

k = eri lämpötiloissa mitattu nopeusvakio

E = aktivaatioenergia [kJ/mol]

T = absoluuttinen lämpötila [K]

R = kaasuvakio [8,314 J/mol.K]

Aktivaatioenergia lasketaan regressioanalyysillä tai seuraavalla yhtälöllä:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

Tällöin: $T_2 > T_1$.

▼B

Liite 3

Puskurijärjestelmät

A. **CLARK JA LUBS:**

Clarkin ja Lubsin puskuriseokset (*)

Koostumus	pH
0,2 N HC1 JA 0,2 N KC1 20 ºC:ssa	
47,5 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	1,0
32,25 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	1,2
20,75 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	1,4
13,15 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	1,6
8,3 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	1,8
5,3 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	2,0
3,35 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	2,2
0,1 M kaliumbiftalaatti + 0,1 N HC1 20 ºC:ssa	
46,70 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	2,2
39,60 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	2,4
32,95 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	2,6
26,42 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	2,8
20,32 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	3,0
14,70 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	3,2
9,90 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	3,4
5,97 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	3,6
2,63 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	3,8
0,1 M kaliumbiftalaatti + 0,1 N NaOH 20 ºC:ssa	
0,40 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	4,0
3,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	4,2
7,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	4,4
12,15 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	4,6
17,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	4,8

(*) Näissä taulukoissa ilmoitetut pH-arvot on laskettu potentiaalimittausten perusteella käyttäen Sörensenin vakioyhtälöitä (1909). Vastaavat pH-arvot ovat 0,04 yksikköä suuremmat kuin taulukossa olevat arvot.

▼B

Koostumus	pH
23,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	5,0
29,95 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	5,2
35,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	5,4
39,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	5,6
43,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	5,8
45,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	6,0

0,1 M monokaliumfosfaatti + 0,1 N NaOH 20 ºC:ssa	
5,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	6,0
8,60 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	6,2
12,60 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	6,4
17,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	6,6
23,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	6,8
29,63 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	7,0
35,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	7,2
39,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	7,4
42,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	7,6
45,20 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	7,8
46,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	8,0
0,1 M H3B03 0,1 M KC1:ssa + 0,1 N NaOH 20 ºC:ssa	
2,61 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	7,8
3,97 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	8,0
5,90 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	8,2
8,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	8,4
12,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	8,6
16,30 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	8,8
21,30 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	9,0
26,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	9,2

▼B

32,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	9,4
36,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	9,6
40,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	9,8
43,90 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	10,0

B. **KOLTHOFF JA VLEESCHHOUWER:**

Kolthoffin ja Vleeschhouwerin sitraattipuskurit

Koostumus	pH
0,1 M monokaliumsitraatti ja 0,1 N HC1 18 ºC:ssa (*)	
49,7 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	2,2
43,4 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	2,4
36,8 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	2,6
30,2 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	2,8
23,6 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	3,0
17,2 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	3,2
10,7 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	3,4
4,2 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	3,6
0,1 M monokaliumsitraatti ja 0,1 N NaOH 18 ºC:ssa (*)	
2,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	3,8
9,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	4,0
16,3 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	4,2
23,7 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	4,4
31,5 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	4,6
39,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	4,8
46,7 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	5,0
54,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	5,2
61,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	5,4
68,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	5,6
74,4 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	5,8
81,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	6,0

(*) Lisätään pieni tymolikide tai muuta samantyyppistä ainetta homesienien kasvun estämiseksi.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Sörensenin boraattiseokset

Koostumus		Sörensen	Walbum, pH		
ml. Borax	ml. HC1/NaOH	18 °C	10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borax + + 0,1 N HC1					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M borax + + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Sörensenin fosfaattiseokset

Koostumus	pH
0,0667 M monokaliumfosfaatti + 0,0667 M dinatriumfosfaatti 20 °C:ssa	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH2PO4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH2PO4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8 **MYRKYLLISYYSTUTKIMUS MADOILLA**

KEINOMAATESTI

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Tässä laboratoriokokeessa testattavaa ainetta lisätään keinotekoiseen maahan, jossa matoja pidetään 14 vuorokautta. Tämän ajan kuluttua (ja valinnaisesti 7 vuorokauden kuluttua) aineen tappava vaikutus matoihin tutkitaan. Tällä testillä voidaan suhteellisen lyhyen ajan kuluessa seuloa ravinnon yhteydessä saatujen tai ihon kautta imeytyneiden kemikaalien vaikutukset matoihin.

1.2 MÄÄRITELMÄ JA YKSIKKÖ

LC_{50}: Aineen pitoisuus, jonka arvioidaan tappavan 50 % koe-eläimistä koeajan kuluessa.

1.3 VERTAILUAINE

Vertailuainetta käytetään ajoittain osoittamaan, että testin herkkyys ei ole merkittävästi muuttunut.

Vertailuaineena suositellaan käytettäväksi analyysilaatuista klooriasetamidia.

1.4 TESTIN PERIAATE

Koska mullan koostumus vaihtelee, tässä testissä käytetään tarkoin määritettyä keinotekoista savimaata. *Eisenia foetida* -lajin (ks. lisäyksen huomautus) täysikasvuisia matoja kasvatetaan koostumukseltaan tunnetussa keinotekoisessa savimaassa, johon on lisätty testattavaa ainetta erisuuruisina pitoisuuksina. Astioiden sisältö levitetään tarjottimelle 14 vuorokauden (ja valinnaisesti 7 vuorokauden) kuluttua testin alkamisesta ja elossaolevien matojen määrä lasketaan kutakin pitoisuutta kohden.

1.5 LAATUKRITEERIT

Testi on suunniteltu siten, että se on mahdollisimman helppo toistaa suhteessa käytettyyn substraattiin ja organismiin. Kontrollien kuolleisuus saa olla korkeintaan 10 % testin lopussa, muussa tapauksessa testi hylätään.

1.6 TESTIN KUVAUS

1.6.1 *Materiaalit*

1.6.1.1 Testissä käytettävä substraatti

Testin perussubstraattina käytetään määrätyn laatuista keinotekoista maata.

a) Perussubstraatti (prosentit tarkoittavat kuivapainoa):

— 10 % rahkasuoturvetta (pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0, ei näkyviä kasvijäänteitä ja hienoksi jauhettuna),

▼B

— 20 % kaoliniittisavea, jossa kaoliniitin osuuden olisi oltava yli 50 %,

— noin 69 % teollista kvartsihiekkaa (pääosin hienoa hiekkaa, jossa yli 50 % 0,05–0,2 mm:n hiukkasia). Ellei aine ole kyllin vesiliukoista, kutakin koeastiaa kohden varataan 10 g, johon testattava aine myöhemmin sekoitetaan.

— noin 1 % jauhettua, kemiallisesti puhdasta kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$), jolla pH-arvoksi säädetään 6,0 ± 0,5.

b) Testissä käytettävä substraatti:

Testissä käytettävä substraatti sisältää perussubstraattia, testattavaa ainetta ja ionisoimatonta vettä.

Vesipitoisuus on noin 25–42 % perussubstraatin kuivapainosta. Substraatin vesipitoisuus määritetään kuivaamalla näyte vakiopainoon 105 °C:n lämmössä. Päävaatimuksena on, että keinomaata on kostutettava siten, ettei siihen jää seisovaa vettä. Testattava aine on sekoitettava tasaisesti substraattiin. Testattavan aineen ja substraatin yhdistämistapa on ilmoitettava.

c) Kontrollisubstraatti:

Kontrollisubstraatti sisältää perussubstraattia ja vettä. Lisäaineita käytettäessä valmistetaan toinen kontrollisubstraatti, joka sisältää saman määrän lisäainetta.

1.6.1.2 Koeastiat

Noin litran vetoisiin lasiastioihin (jotka peitetään muovikannella, lautasella tai rei'itetyllä muovikalvolla) laitetaan märkää koe- tai kontrollisubstraattia 500 g:n kuivapainoa vastaava määrä.

1.6.2 *Koeolosuhteet*

Astiat laitetaan ilmastoituun kammioon, jossa on 20 ± 2 °C:n lämpötila ja jatkuva valaistus. Valon voimakkuuden on oltava 400–800 luxia.

Koeaika on 14 vuorokautta, mutta kuolleisuus voidaan määrittää myös seitsemän vuorokauden kuluttua testin aloittamisesta.

1.6.3 *Testin suorittaminen*

Testissä käytettävät pitoisuudet

Testattavan aineen pitoisuudet ilmoitetaan aineen painona suhteessa perussubstraatin kuivapainoon (mg/kg).

Raja-annostesti

Raja-annostestillä voidaan määrittää pitoisuusrajat, jotka aiheuttavat 0–100 % kuolleisuuden. Näiden rajojen perusteella määrätään varsinaisessa testissä käytettävät pitoisuudet.

▼B

Seuraavat pitoisuudet on testattava: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg testattavaa ainetta/kg testissä käytettyä substraattia (kuivapaino).

Mikäli varsinainen testi tehdään täydellisenä, kunkin pitoisuuden ja yhden alustamattoman kontrollin testaaminen 10 madon erällä saattaa olla riittävän tarkka raja-annostesti.

Varsinainen testi

Raja-annostestin tulosten perusteella määritetään vähintään viisi pitoisuutta geometrisenä sarjana, joka kattaa 0–100 % kuolleisuuden, ja jonka erottava vakiotekijä on korkeintaan 1,8.

Tätä pitoisuussarjaa käyttävillä testeillä olisi voitava arvioida LC_{50}-arvo ja sen luotettavuusrajat mahdollisimman tarkasti.

Varsinaisessa testissä käytetään vähintään neljää testiryhmää kullakin annostasolla sekä neljää altistamatonta kontrolliryhmää, joissa on kussakin 10 matoa. Tuloksia ilmoitettaessa näistä rinnakkaisryhmistä ilmoitetaan keskiarvot ja keskipoikkeamat.

Kun kaksi peräkkäistä pitoisuutta, joiden erottava tekijä on 1,8, antavat ainoastaan 0 % ja 100 % kuolleisuuden, nämä kaksi arvoa riittävät osoittamaan LC_{50}-välin.

Testissä käytettävän perussubstraatin ja testattavan aineen seos

Testissä käytettävä substraatti on valmistettava, jos mahdollista, ilman muita lisäaineita kuin vettä, ionisoimattomaan veteen tai muuhun liuottimeen emulgoitu tai dispergoitu testattava aine sekoitetaan perussubstraattiin tai suihkutetaan tasaisesti sen pintaan hienolla kromatografisella tai vastaavalla sumuttimella juuri ennen testin alkua.

Jos aine ei liukene veteen, se voidaan liuottaa mahdollisimman pieneen määrään jotakin orgaanista liuotinta (esimerkiksi heksaamiin, asetoniin tai kloroformiin).

Vain herkästi haihtuvia liuottimia voidaan käyttää testattavan aineen liuottamiseen, dispergoimiseen tai emulgoimiseen. Testissä käytettävä substraatti on tuuletettava ennen käyttöä. Haihtuneen veden määrä on korvattava. Kontrollin on sisällettävä sama määrä apuainetta.

Ellei testattavaa ainetta voida liuottaa, dispergoida tai emulgoida orgaanisiin liuottimiin, 10 g hienoksi jauhettua kvartsihiekkaa ja kuivapainoltaan 500 grammaan keinomaata tarvittava määrä testattavaa ainetta yhdistetään ja sekoitetaan 490 grammaan (kuivapaino) testissä käytettävää substraattia.

Kutakin koe-erää varten laitetaan lasiastiaan 500 gramman kuivapainoa vastaava määrä märkää koesubstraattia ja asetetaan 10 matoa koesubstraatin pinnalle. Matoja on tätä ennen sopeutettu 24 tuntia samanlaiseen märkään perussubstraattiin, jonka jälkeen ne on pesty nopeasti ja liika vesi imeytetty suodatinpaperiin.

▼B

Astiat peitetään rei'itetyillä muovikansilla, lautasilla tai kalvolla kuivumisen estämiseksi ja pidetään koeolosuhteissa 14 vuorokautta.

Määritykset suoritetaan 14 vuorokauden (ja valinnaisesti 7 vuorokauden) kuluttua testin alkamisesta. Substraatti levitetään lasia tai ruostumatonta terästä olevalle levylle. Madot tutkitaan ja elossa olevien matojen määrä lasketaan. Mato katsotaan kuolleeksi, ellei se reagoi keveään mekaaniseen etupään ärsytykseen.

Jos tutkimus tehdään 7 vuorokauden kuluttua, sama substraatti laitetaan takaisin astiaan ja elossa olevat madot sen pinnalle.

1.6.4 *Koeorganismit*

Koeorganismeina käytetään täysikasvuisia *Eisenia foetida* -matoja (ks. lisäyksen huomautus) (vähintään kahden kuukauden ikäisiä matoja, joilla on clitellum-paksunnos), joiden märkäpaino on 300–600 mg. (Kasvatus — ks. lisäys.)

2. TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY JA ARVIOINTI

Ilmoitetaan testatun aineen pitoisuudet ja matojen kuolleisuusprosentti kutakin pitoisuutta kohden.

Mikäli LC_{50}-arvo ja luotettavuusrajat ($p = 0,05$) pystytään määrittämään tulosten perusteella, määritys on tehtävä jotakin standardimenetelmää käyttäen (Litchfield ja Wilcoxon, 1949 tai vastaava menetelmä). LC_{50} ilmoitetaan milligrammoina testattavaa ainetta testissä käytettyä substraattikilogrammaa (kuivapaino) kohden.

Jos pitoisuuskäyrän kaltevuus on liian jyrkkä LC_{50}-arvon laskemiseksi, graafinen arvio tästä arvosta riittää.

Kun kaksi peräkkäistä pitoisuutta, joiden erottava tekijä on 1,8, antavat ainoastaan 0 % ja 100 % kuolleisuuden, nämä kaksi arvoa riittävät osoittamaan LC_{50}-välin.

3. RAPORTOINTI

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— vakuutus, että koe on suoritettu edellä olevien laatuvaatimusten mukaisesti,

— tehty testi (raja-annostesti ja/tai varsinainen testi),

— tarkka selostus koeolosuhteista tai vakuutus, että testi on suoritettu menetelmän mukaisesti; poikkeamat on ilmoitettava,

— tarkka selostus siitä, millä tavoin testattava aine sekoitettiin testissä käytettyyn substraattiin,

— tiedot koeorganismeista, (laji, ikä, keskipaino ja painorajat, elin- ja kasvatusolosuhteet, hankintapaikka),

▼B

— LC_{50}-arvon määritysmenetelmä,

— testitulokset ja kaikki käytetyt tiedot,

— selostus koe-organismeissa havaituista oireista tai käyttäytymismuutoksista,

— kontrollien kuolleisuus,

— LC_{50} tai korkein testattu pitoisuus, joka ei aiheuttanut kuolleisuutta ja alin testattu pitoisuus, joka aiheutti 100 % kuolleisuuden 14 vuorokauden (sekä valinnaisesti 7 vuorokauden) kuluttua testin alkamisesta,

— pitoisuus/vastekäyrä,

— vertailuaineella joko tästä testistä tai aikaisemmista laaduntarkkailukokeista saadut tulokset.

4. **LÄHDELUETTELO**

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 207,* Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Edwards, C. A. and Lofty, J.R., 1977, *Biology of Earthworms,* Chapman and Hall, London, 331 s.

3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecologie et Systematique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 s.

4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F, A simplified method of evaluation dose effect experiments, *J. Pharm. Exs. Therap.,* vol. 96, 1949, s. 99.

5) Euroopan yhteisöjen komissio, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms,* Report EUR 8714 EN, 1983.

6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag ”Toxizitätstest am Regenworm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden” in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Lisäys

Matojen lisääminen ja kasvatus ennen testausta

Matoja lisättäessä 30–50 täysikasvuista matoa pannaan tuoretta substraattia sisältävään lisääntymislaatikkoon 14 vuorokauden ajaksi. Niitä voidaan käyttää lisääntymiseen useita kertoja. Munista syntyneitä matoja käytetään kokeisiin niiden tultua täysikasvuisiksi (määritellyissä olosuhteissa parin kolmen kuukauden kuluttua).

Kasvatus- ja lisääntymisolosuhteet

Ilmastoitu kammio:	20 ± 2 °C:n lämpötila ja jatkuva valaistus (valon voimakkuus 400-800 luxia).
Lisäyslaatikot:	matalia 10–20 litran vetoisia astioita.
Substraatti:	*Eisenia foetida* -matoja voidaan kasvattaa eläinten lannassa. Suositeltava lisäysalusta on sekoitus, jossa on 50 % turvetta ja 50 % hevosen tai lehmän lantaa. Elatusalustan pH-arvon on oltava 6–7 (säädetään kalsiumkarbonaatilla) ja sen ionijohtavuuden alhainen (alle 6 mm hos tai 0,5 % suolapitoisuus). Substraatin on oltava kosteaa, mutta ei märkää. Edellä esitetyn lisäksi voidaan käyttää muitakin menettelytapoja.

Huom. Eisenia foetidaa on kahta rotua, jotka eräät taksonomit ovat erottaneet eri lajeiksi (Bouche, 1972). Ne ovat morfologisesti samanlaisia, mutta toisen, *Eisenia foetida foetidan*, jaokkeissa on tyypillinen poikittainen raidoitus tai juovaisuus kun taas toiselta, vaihtelevan punaväriseltä *Eisenia foetida andreilta*, raidoitus puuttuu. *Eisenia foetida andrei* on suositeltavin koelaji. Muitakin lajeja voidaan käyttää, tarvittavien menetelmien ollessa käytössä

▼B

C.9 **BIOLOGINEN HAJOAMINEN**

ZAHN-WELLENS-TESTI

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Tämän menetelmän tarkoituksena on määrittää vesiliukoisten haihtumattomien orgaanisten aineiden mahdollinen lopullinen biologinen hajoaminen, kun ne altistetaan suurehkoille mikro-organismipitoisuuksille staattisessa testissä.

Kiinteiden aineiden suspensioissa voi tapahtua fysikaalis-kemiallista adsorpiota, ja tämä on otettava huomioon tuloksia tulkittaessa (ks. 3.2).

Tutkittavista aineista käytetään 50–400 mg/l DOC-arvoja tai 100–1 000 mg/l COD-arvoja vastaavaa pitoisuutta (DOC= dissolved organic carbon, liuennut orgaaninen hiili; COD= chemical oxygen demand, kemiallinen hapenkulutus). Näiden suurehkojen pitoisuuksien etuna on analyyttinen luotettavuus. Yhdisteet, joilla on myrkyllisiä ominaisuuksia, voivat hidastaa hajoamistapahtumaa tai estää sen.

Tässä menetelmässä testattavan aineen lopullisen biologisen hajoamisen määrittämiseen käytetään liuenneen orgaanisen hiilen määrää tai kemiallista hapenkulutusta.

Samanaikaisesti käytetyllä ominaisella analyysimenetelmällä voidaan määrittää aineen biologinen primaarihajoaminen (alkuperäisen kemiallisen rakenteen häviäminen).

Tällä menetelmällä voidaan tutkia vain sellaisia orgaanisia aineita, jotka testissä käytetyn pitoisuuden osalta täyttävät seuraavat edellytykset:

— ne ovat vesiliukoisia koeolosuhteissa,

— niiden höyrynpaine on mitätön koeolosuhteissa,

— ne eivät estä bakteeritoimintaa,

— ne adsorboituvat käytetyssä testissä vain rajoitetusti,

— ne eivät poistu testiliuoksesta vaahtoamisen vuoksi.

Tiedot testattavan materiaalin pääaineosien suhteellisista osuuksista auttavat tulosten tulkinnassa, varsinkin jos tulokset ovat alhaisia tai marginaalisia.

Tiedot aineen myrkyllisyydestä mikro-organismeille auttavat alhaisten tulosten tulkinnassa ja oikeiden pitoisuuksien valinnassa.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Testin lopussa saavutettu hajoamisaste ilmoitetaan muodossa ”Biologinen hajoaminen Zahn-Wellens-testissä”

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

jossa

D_T = biologinen hajoaminen (%) ajan hetkellä T,

C_A = testattavan seoksen DOC (tai COD)-arvot mitattuna kolmen tunnin kuluttua testin alkamisesta (mg/l), (DOC = dissolved organic carbon, liuennut orgaaninen hiili; COD = chemical oxygen demand, kemiallinen hapenkulutus),

C_T = testattavan seoksen DOC- tai COD-arvot näytteenottohetkellä (mg/l),

C_B = nollakokeen DOC- tai COD-arvot näytteenottoaikana (mg/l),

CBA = nollakokeen DOC- tai COD-arvot mitattuna kolmen tunnin kuluttua testin alkamisesta (mg/l).

Hajoamisaste pyöristetään lähimpään kokonaiseen prosenttiin.

Hajoamisprosentti ilmoitetaan testattavasta aineesta poistuneen liuenneen orgaanisen hiilen (tai kemiallisen hapenkulutuksen) poistumaprosenttina.

Kolmen tunnin kuluttua määritetyn arvon ja lasketun tai mieluimmin määritetyn alkuarvon ero voi antaa hyödyllistä tietoa aineen poistumasta (ks. 3.2, tulosten tulkinta).

1.3 VERTAILUAINEET

Uusia aineita tutkittaessa vertailuaineista saattaa joissakin tapauksissa olla hyötyä. Sopivia vertailuaineita ei kuitenkaan voida vielä suositella.

1.4 TESTIN PERIAATE

Laitetaan aktiivilietettä, mineraaliravinteita ja testattavaa ainetta ainoana hiilen lähteenä sisältävää vesiliuosta 1–4 litran vetoiseen, sekoittajalla ja ilmastajalla varustettuun lasiastiaan. Seosta sekoitetaan ja ilmastetaan 20–25 °C:n lämpötilassa hajavalossa tai pimeässä enintään 28 päivää. Hajoamistapahtumaa seurataan määrittämällä DOC- (tai COD-)arvot suodatetusta liuoksesta päivittäin tai jotakin muuta määräaikaa noudattaen. Kukin määräajoin mitattu DOC- (tai COD-) poistuma suhteessa kolme tuntia testin alkamisen jälkeen suoritettuun määritykseen ilmoitetaan biologisena hajoamisprosenttina ja se osoittaa senhetkisen hajoamisasteen. Tulos esitetään graafisesti suhteessa aikaan, jolloin saadaan biologinen hajoamiskäyrä.

Alkuperäisen molekyylipitoisuuden biologisesta hajoamisesta johtuvat muutokset voidaan mitata käyttämällä jotakin analyyttistä menetelmää (biologinen primaarihajoaminen).

▼B

1.5 LAATUVAATIMUKSET

Tämän testin toistettavuus on todettu tyydyttäväksi rengasreaktion avulla.

Menetelmän herkkyys määräytyy suurelta osin nollatestin vaihtelevuuden ja jossakin määrin liuenneen orgaanisen hiilen määritystarkkuuden sekä liuoksen sisältämän testattavan aineen pitoisuuden mukaan.

1.6 TESTIN KUVAUS

1.6.1 *Testin valmistelu*

1.6.1.1 Reagenssit

Testissä käytetty vesi: juomavettä, jonka orgaaninen hiilipitoisuus on < 5 mg/l. Kalsium- ja magnesiumionien yhteispitoisuus saa olla enintään 2,7 mmol/1, muussa tapauksessa on suoritettava tarvittava laimennus ionisoimattomalla tai tislatulla vedellä.

Rikkihappo, analyyttinen laatu (A. R.):	50 g/l
Natriumhydroksidiliuos, A. R.:	40 g/l
Mineraaliravinneliuos: liuotetaan litraan ionisoimatonta vettä:	
ammoniumkloridia, NH_4Cl, A. R.:	38,5 g,
natriumdivetyfosfaattia, $NaH_2PO_4.2H_2O$, A. R.:	33,4 g,
kaliumdivetyfosfaattia, KH_2PO_4, A. R.:	8,5 g,
dikaliummonovetyfosfaattia K_2HPO_4, A. R.:	21,75 g.

Seos toimii sekä ravinteena että puskurijärjestelmänä.

1.6.1.2 Laitteet

Lasiastioita, joiden vetoisuus on 1–4 litraa (esimerkiksi sylinterimäisiä astioita).

Sähkösekoittaja, jossa on varrellinen lasi- tai metallisekoitin (sekoittimen on pyörittävä 5–10 cm astian pohjan yläpuolella). Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää magneettisekoitinta, jossa sauvan pituus on 7–10 cm.

Lasiputki, jonka sisähalkaisija on 2-4 mm, ilmastusta varten. Putken pään on oltava noin 1 cm astian pohjasta.

Sentrifugi (noin 3 550 g).

pH-mittari.

Liuenneen hapen mittari.

Paperisuodattimia.

▼B

Kalvosuodatinlaite.

Kalvosuodattimia, huokoskoko 0,45 μm. Kalvosuodattimia voidaan käyttää, jos on varmistuttu siitä, että ne eivät vapauta hiiltä eivätkä absorboi testattavaa ainetta suodatusvaiheessa.

Analyysilaitteet orgaanisen hiilen pitoisuuden ja kemiallisen hapen tarpeen määritystä varten.

1.6.1.3 Inokulaaton valmistus

Biologisesta käsittelylaitoksesta peräisin oleva aktiiviliete pestään sentrifugoimalla (toistuvasti) tai antamalla sen laskeutua testissä käytettävässä vedessä (edellä).

Aktiivilietteen on oltava laadultaan soveltuvaa. Tällaista lietettä on saatavilla hyvin toimivasta jätevesien käsittelylaitoksesta. Jotta lietteessä olisi mahdollisimman monta bakteerilajia tai -kantaa, saattaa olla tarpeen sekoittaa useasta lähteestä otettuja inokulaatteja (esimerkiksi eri jätteenkäsittelylaitokset, maaperä, jokivedet jne.). Seos käsitellään edellä selostetulla tavalla.

Aktiivilietteen tehokkuuden tarkistus — ks. ”toimivuuskontrolli” jäljempänä.

1.6.1.4 Koeliuosten valmistus

Koeastiaan pannaan 500 ml testissä käytettävää vettä, 2,5 ml/l mineraaliravinneliuosta ja aktiivilietettä niin paljon, että sen määrä lopullisessa seoksessa vastaa 0,2 - 1,0 g/l kuiva-ainetta. Testattavasta aineesta valmistettua varastoliuosta lisätään niin paljon, että lopullisen seoksen DOC-pitoisuus on 50–400 mg/l. Vastaavat COD-arvot ovat 100–1 000 mg/l. Testissä käytettävää vettä lisätään niin paljon, että liuoksen kokonaismääräksi saadaan 1–4 litraa. Kokonaismäärä riippuu siitä, kuinka monta näytettä otetaan DOC- tai COD-määrityksiä varten ja paljonko seosta tarvitaan analyyseihin.

Yleensä kaksi litraa on riittävä määrä. Testiin sisältyy vähintään yksi kontrolliastia (nollakoe), joka sisältää ainoastaan aktiivilietettä ja mineraaliravinneliuosta ja testissä käytettyä vettä niin paljon, että sen kokonaismäärä on sama kuin koeastioissa oleva.

1.6.2 *Testin suorittaminen*

Koeastioita sekoitetaan magneetti- tai potkurisekoittajalla hajavalossa tai pimeässä huoneessa 20–25 °C:n lämpötilassa. Ilmastus tehdään paineilmalla, joka puhdistetaan tarvittaessa pesupullon ja vanusuodattimen avulla. On pidettävä huolta siitä, ettei liete laskeudu eikä happipitoisuus putoa alle 2 mg/l.

pH-arvo on tarkistettava määräajoin (esimerkiksi päivittäin) ja pH-arvoksi säädettävä tarvittaessa 7–8.

▼B

Haihtunut nestemäärä korvataan ennen kutakin näytteenottoa lisäämällä tarvittava määrä ionisoimatonta tai tislattua vettä. Suositeltavaa on merkitä nesteen taso astian kylkeen ennen testin aloittamista. Uusi merkintä tehdään kunkin näytteenoton jälkeen (ilmastamatta ja sekoittamatta). Ensimmäiset näytteet otetaan aina kolmen tunnin kuluttua testin alkamisesta, jotta voidaan todeta, adsorboituuko testattava aine aktiivilietteeseen.

Testattavan aineen häviämistä seurataan DOC- tai COD-määrityksin, jotka tehdään päivittäin tai muuten säännöllisin väliajoin. Koeastiasta ja nollakoeastiasta otetut näytteet suodatetaan huolellisesti pestyn paperisuodattimen läpi. Ensimmäiset 5 ml testattavan aineen suodosta heitetään pois. Vaikeasti suodatettavat lietteet voidaan poistaa suodatusta edeltävällä 10 minuutin sentrifugoinnilla. DOC- ja COD-määritykset tehdään vähintään kahtena kappaleena. Testin kesto on enintään 28 päivää.

Huom. Sameina pysyvät näytteet suodatetaan kalvosuodattimella. Kalvosuodattimet eivät saa päästää eivätkä adsorboida mitään orgaanista ainetta.

Aktiivilietteen toimivuuskontrolli

Kuhunkin koesarjaan on sisällytettävä tunnettua ainetta sisältävä koeastia aktiivilietteen toiminnan testaamista varten. Dietyleeniglykoli on osoittautunut tähän tarkoitukseen sopivaksi.

Adaptaatio

Kun analyysejä tehdään suhteellisen lyhyin väliajoin (esim. päivittäin), adaptaatio voidaan selvästi todeta hajoamiskäyrältä (ks. kuva 2). Sen vuoksi testiä ei saa aloittaa juuri ennen viikonloppua.

Jos adaptaatio tapahtuu koeajan lopulla, koetta voidaan jatkaa, kunnes hajoaminen loppuu.

Huom. Jos adaptoituneesta lietteestä tarvitaan laajempia tietoja, samaa aktiivilietettä testataan uudelleen saman koemateriaalin kanssa seuraavasti:

Sekoitus ja ilmastus lopetetaan ja aktiivilietteen annetaan laskeutua. Kelluva neste poistetaan, testissä käytettyä vettä lisätään, kunnes kokonaismäärä on kaksi litraa, sekoitetaan 15 minuuttia ja annetaan laskeutua uudelleen. Kun kelluva neste on jälleen poistettu, testi uusitaan jäljellä olevalla lietteellä samaa materiaalia käyttäen 1.6.1.4 ja 1.6.2 kohtien mukaisesti. Aktiiviliete voidaan myös erottaa sentrifugoimalla selkeyttämisen sijasta.

Adaptoinutta lietettä voidaan sekoittaa tuoreeseen lietteeseen siten, että kuivapainopitoisuus on 0,2–1 g/l.

▼B

Analyysit

Näytteet suodatetaan yleensä huolellisesti pestyllä paperisuodattimella (pesuun käytetään ionisoimatonta vettä).

Sameiksi jäävät näytteet suodatetaan kalvosuodattimella (0,45 μm).

Näytteiden suodoksista (ensimmäiset 5 ml kaadetaan pois) määritetään TOC-mittauslaitteen avulla DOC- ja/tai COD-pitoisuudet kahtena kappaleena. Ellei suodosta analysoida samana päivänä, se on säilytettävä jääkaapissa seuraavaan päivään. Pidempää säilytysaikaa ei suositella.

COD-pitoisuus määritetään näytesuodoksista COD-analyysilaitteilla allaolevassa lähdeviitteessä (2) esitetyllä tavalla.

2. TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

DOC- ja/tai COD-pitoisuudet määritetään näytteistä vähintään kahtena kappaleena edelläolevan 1.6.2 kohdan mukaisesti. Aikana T tapahtunut hajoaminen lasketaan 1.2 kohdassa annetun kaavan (ja määritelmien) mukaisesti.

Hajoamisaste pyöristetään lähimpään kokonaiseen prosenttiin. Testin lopussa saavutettu hajoamisaste ilmoitetaan muodossa ”Biologinen hajoaminen Zahn-Wellens-testissä”.

Huomautus: Jos täydellinen hajoaminen tapahtuu ennen testin loppua ja tämä tulos varmistetaan uudella analyysillä seuraavana päivänä, koe voidaan lopettaa.

3. RAPORTOINTI

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat kohdat:

— aineen alkupitoisuus,

— kaikki muut testattua ainetta, vertailuainetta ja nollakoetta koskevat tiedot ja tutkimustulokset,

— pitoisuus kolmen tunnin kuluttua,

— hajoamiskäyrä ja selostus,

— koeorganismien hankintapaikka ja -aika, adaptaatioaste, käytetyt pitoisuudet jne.,

— testausmenetelmään tehtyjen muutosten tieteelliset perustelut.

3.2 TULOSTEN TULKINTA

DOC- (COD)-poistuma, joka tapahtuu asteittain päivien tai viikkojen kuluessa, osoittaa testattavan aineen biologisen hajoamisen.

▼B

Fysikaalis-kemiallisella adsorptiolla voi kuitenkin eräissä tapauksissa olla tietty vaikutus, joka ilmenee testin alussa ensimmäisten kolmen tunnin aikana tapahtuvana täydellisenä tai osittaisena poistumana ja kontrolli- ja koeliuosten kelluvien nesteiden eron pysymisenä odottamattoman pienenä.

Lisätutkimuksia tarvitaan, jos biologinen hajoaminen (tai osittainen biologinen hajoaminen) ja adsorptio halutaan erottaa toisistaan.

Tämä voidaan tehdä usealla tavalla, mutta luotettavin tapa on käyttää kelluvaa nestettä tai lietettä inokulaattina perussarjan testissä (mieluimmin respirometritestissä).

Testattavia aineita, joiden DOC- (COD)-poistuma ilman adsorptiota on tässä testissä korkea, voidaan pitää biologisesti hajoavina. Osittainen poistuma ilman adsorptiota osoittaa, että kemikaali hajoaa biologisesti ainakin jossakin määrin. Alhainen tai nollapoistuma saattaa johtua testattavan aineen mikro-organismeihin kohdistuvasta inhibitiosta, joka voi myös ilmetä lietteen liukenemisena ja häviämisenä, jolloin kelluva neste on sameaa. Koe on uusittava käyttämällä testattavasta aineesta alhaisempaa pitoisuutta.

Suurempi herkkyys saadaan käyttämällä yhdistekohtaista analyysimenetelmää tai ^{14}C:llä merkittyä testattavaa ainetta. Mikäli testattava yhdiste on merkitty ^{14}C:llä, $^{14}CO_2$:n toteaminen osoittaa, että biologista hajoamista on tapahtunut.

Kun tulokset ilmoitetaan ensisijaisena hajoamisena, alkuperäisen testattavan aineen reagoimattomuuteen johtanut kemiallinen rakennemuutos tulisi mahdollisuuksien mukaan selvittää.

Analyysimenetelmän kelpoisuus on ilmoitettava samoin kuin nollakokeen elatusaineesta saatu vaste.

4. LÄHDELUETTELO

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B,* Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, Official Journal of the European Communities, No L 251, 19.9.1984.

▼B

Lisäys

ARVIOINTIESIMERKKI

Orgaaninen yhdiste:	4-Etoksibentsoehappo
Teoreettinen testipitoisuus:	600 mg/l
Teoreettinen DOC:	390 mg/l
Inokulaatti:	Jätteenpuhdistuslaitoksen nimi
Pitoisuus:	1 gramma kuivamateriaalia/litra
Adaptaatioaste:	ei adaptoitunut
Analyysi:	DOC-määritys
Näytteen koko:	3 ml
Kontrollialue:	Dietyleeniglykoli
Yhdisteen myrkyllisyys:	Ei myrkyllisiä vaikutuksia alle 1 000 mg/l Käytetty testi: Fermentaatioputkitesti

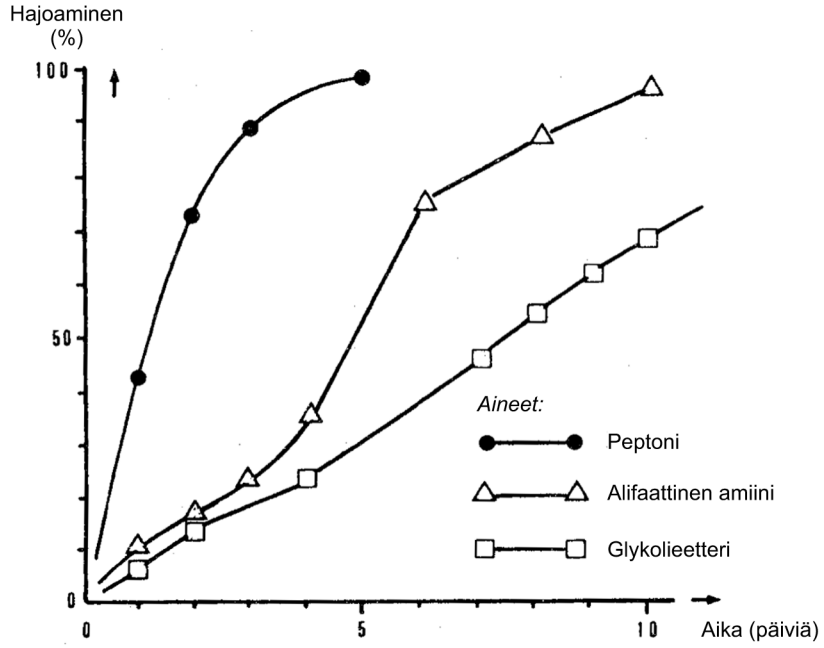
Ajat	Kontrolliaine				Testattava aine		
	DOC (1) mg/l	DOC (1) mg/l	netto DOC mg/l	Hajoaminen %	DOC (1) mg/l	netto DOC mg/l	Hajoaminen %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 tuntia	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 päivä	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 päivää	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 päivää	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 päivää	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 päivää	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 päivää	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 päivää	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 päivää	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Kolminkertaisten määritysten keskiarvo.

▼B

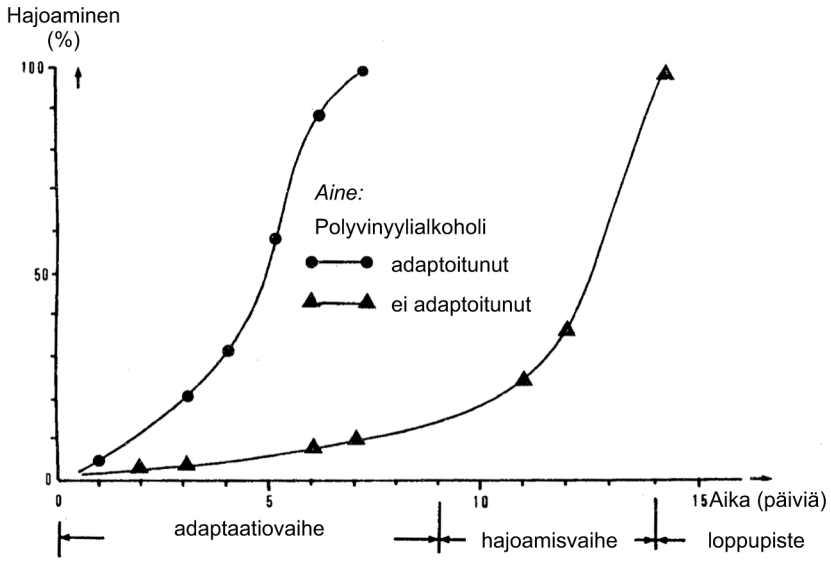
Kuva 1

Esimerkkejä biologisista hajoamiskäyristä



Kuva 1

Esimerkkejä lietten adaptaatiosta



▼M4

C.10 **SIMULAATIOTUTKIMUS: AEROBINEN VIEMÄRILIETTEEN KÄSITTELY: C.10-A: AKTIIVILIETEYKSIKÖT – C.10-B: BIOKALVOT**

C.10-A: Aktiivilieteyksiköt

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 303 (2001). 1950-luvulla havaittiin, että uudet pinta-aktiiviset aineet aiheuttivat liiallista vaahtoutumista jätevedenpuhdistamoissa ja joissa. Aerobinen käsittely ei poistanut niitä kokonaan, ja ne rajoittivat joissakin tapauksissa muun orgaanisen aineksen poistoa. Tästä syystä käynnistettiin useita tutkimuksia siitä, miten pinta-aktiiviset aineet voidaan poistaa jätevesistä ja miten jäteveden puhdistus tehoaa teollisuuden tuottamiin uusiin kemikaaleihin. Tähän tarkoitukseen käytettiin malliyksiköitä, jotka edustivat kahta aerobisen biologisen jäteveden puhdistuksen päätyyppiä (aktiivilietettä ja biosuodatusta eli tihkusuodatusta). Olisi ollut epäkäytännöllistä ja hyvin kallista jakaa jokaista uutta kemikaalia ja seurata kaikkia suuria jätevedenpuhdistamoja edes paikallisesti.

ALUSTAVAT HUOMIOT

Aktiivilieteyksiköt

2. Simuloitujen aktiivilieteyksikköjen kooksi on ilmoitettu 300–2 000 ml. Osa jäljitteli tarkasti täyden mittakaavan puhdistamoja, ja niissä oli lietteen selkeytyssäiliö, josta selkeytetty liete pumpattiin takaisin ilmastusaltaaseen, kun taas toisissa ei ollut lainkaan selkeytystiloja. Tästä esimerkkinä Swisher (1). Laitteen koko on kompromissi: toisaalta sen on oltava riittävän iso, jotta se on mekaanisesti toimiva eikä näytteiden tarvittava tilavuus häiritse sen toimintaa, mutta toisaalta ei saa olla niin iso, että se vaatii liian suuren tilan tai liikaa materiaaleja.

3. Kaksi laitetyyppiä, joita on käytetty laajasti tyydyttävin tuloksin, ovat Husmannin yksiköt (2), joita käytettiin pinta-aktiivisten aineiden tutkimuksissa, ja huokoiset astiat (3)(4). Nämä on kuvattu tässä testimenetelmässä. Myös muita laitteita, kuten Eckenfelderin (5), on käytetty onnistuneesti. Koska tämän simulaatiotutkimuksen toteuttaminen on melko kallista ja työlästä, rinnalla tutkittiin yksinkertaisempia ja halvempia seulontatestejä, jotka on kuvattu tämän liitteen luvun C.4 kohdassa A-F (6). Kokemus monista pinta-aktiivisista aineista ja muista kemikaaleista on osoittanut, että ne, jotka läpäisivät seulontatestit (helposti biohajoavat), hajosivat myös simulaatiotutkimuksessa. Osa aineista, jotka eivät läpäisseet seulontatestejä, läpäisi luontaisen biohajoavuuden testit (tämän liitteen luvut C.12 (7) ja C.19 (8)), mutta vain osa jälkimmäisistä hajosi simulaatiotutkimuksessa, kun taas ne kemikaalit, jotka eivät läpäisseet luontaisen biohajoavuuden testejä, eivät hajonneet simulaatiotutkimuksissa (9)(10)(11).

4. Simulaatiotutkimukset, joissa käytetään yhtä testiolosuhteiden joukkoa, ovat riittäviä joihinkin tarkoituksiin. Tulokset ilmaistaan testikemikaalin tai liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) poistumaprosentteina. Tällainen testi kuvataan tässä testimenetelmässä. Tässä tekstissä on useita eri muunnelmia toisin kuin tämän luvun edellisessä versiossa, jossa kuvattiin vain yhdentyyppinen

▼M4

laite, jolla käsiteltiin synteettistä jätevettä yhdistettyinä yksikköinä käyttämällä suhteellisen yksinkertaista lietteen poistumatapaa. Tekstissä kuvataan vaihtoehtoisia laitetyyppejä, toimintatapoja sekä jäteveden ja lietteen poistumatapoja. Tämä teksti seuraa tarkasti ISO 11733 -standardin (12) tekstiä, joka on tarkistettu huolellisesti, joskaan testimenetelmää ei ole validoitu laboratorioiden välisessä tutkimuksessa.

5. Muissa tarkoituksissa testikemikaalin pitoisuus poistovirrassa on tiedettävä tarkemmin, ja kattavampi menetelmä on tarpeen. Esimerkiksi lietteen poistumanopeutta on kontrolloitava tarkasti joka päivä ja koko testin keston ajan, ja yksiköitä on käytettävä eri poistumanopeuksilla. Jos halutaan käyttää täysin kattavaa menetelmää, testit on tehtävä kahdessa tai kolmessa eri lämpötilassa. Birch (13)(14) kuvaa tällaisen menetelmän, josta on yhteenveto lisäyksessä 6. Nykytietojen perusteella ei kuitenkaan voida päätellä, mitä kineettisiä malleja voidaan soveltaa kemikaalien biologiseen hajoamiseen jäteveden puhdistuksessa ja yleensä vesiympäristössä. Monodin kineettinen malli, joka on annettu esimerkkinä lisäyksessä 6, soveltuu ainoastaan kemikaaleihin, joiden pitoisuus on vähintään 1 mg/l, mutta joidenkin mielestä tätäkään ei ole vielä näytetty toteen. Lisäyksessä 7 on viitattu testeihin, joissa pitoisuudet vastaavat paremmin todellisia pitoisuuksia jätevesissä, mutta nämä testit sekä lisäyksessä 6 luetellut testit on kuvattu vain lisäyksissä, eikä niitä ole annettu erillisinä testimenetelminä.

Suodattimet

6. Simuloidut biosuodattimet ovat jääneet paljon vähemmälle huomiolle, kenties siksi, että ne ovat hankalampia ja isokokoisempia kuin simuloidut aktiivilietelaitokset. Gerike *et al* kehittivät biologisia suodatinyksiköitä ja käyttivät niitä yhdistettyinä yksiköinä (15). Nämä suodattimet olivat suhteellisen suuria (korkeus 2 m, tilavuus 60 l), ja kuhunkin tarvittiin jätevettä jopa 2 l/h. Baumann *et al* (16) simuloivat biologisia suodattimia upottamalla polyesterifleeceliuskoja konsentroituun aktiivilietteeseen puoleksi tunniksi ja kiinnittämällä liuskat sitten 1 m:n putkiin (sisähalkaisija 14 mm). Testikemikaali, joka oli mineraalisuolaliuoksen ainoa C-lähde, syötettiin pystysuuntaiseen putkeen, ja biologinen hajoaminen arvioitiin mittaamalla DOC poistovirrassa ja CO_2 syntyneessä kaasussa.

7. Biosuodattimia on simuloitu toisella tavalla (15). Pyöriviin putkiin, jotka oli kallistettu pieneen vaakasuuntaiseen kulmaan, syötettiin jätevettä (noin 250 ml/h) testikemikaalin kanssa ja ilman testikemikaalia, ja kerätystä poistovirrasta analysoitiin DOC ja/tai spesifinen testikemikaali.

TESTIN PERIAATE

8. Tämän menetelmän tarkoitus on määrittää poistuma ja aerobisten mikro-organismien aiheuttama vesiliukoisten orgaanisten kemikaalien primaarinen ja/tai lopullinen biohajoaminen jatkuvatoimisessa testijärjestelmässä, joka simuloi aktiivilieteprosessia. Helposti biohajoava orgaaninen aine ja orgaaninen testikemikaali ovat mikro-organismien hiilen ja energian lähteet.

9. Kahta jatkuvatoimista testiyksikköä (aktiivilietelaitoksia tai huokoisia astioita) käytetään rinnakkain identtisissä, testin tarkoitukseen soveltuvissa olosuhteissa. Normaalisti hydraulisen retentioajan keskiarvo on 6 h ja lietteen iän keskiarvo (retentioaika) on 6–10 päivää. Lietettä poistetaan kahdella eri menetelmällä. Lisättävän testikemikaalin pitoisuus on tavallisesti 10–20 mg/l liuennutta orgaanista hiiltä (DOC), ja sitä lisätään vain toisen yksikön tuloveteen (orgaaninen aine). Toista yksikköä käytetään kontrolliyksikkönä, jolla määritetään orgaanisen aineen biologinen hajoaminen.

▼M4

10. Poistovedestä otetaan usein näytteitä, joista määritetään mieluiten DOC tai sitten kemiallinen hapenkulutus (COD) ja testikemikaalin pitoisuus (tarvittaessa) tekemällä sen yksikön poistoveden ominaisanalyysi, johon testikemikaalia lisätään. Poistoveden DOC- tai COD-pitoisuuden erot testi- ja kontrolliyksiköissä johtuvat oletettavasti testikemikaalista tai sen orgaanisista metaboliiteista. Tätä eroa verrataan tuloveden DOC- tai COD-pitoisuuteen, joka johtuu testikemikaalin lisäämisestä, jotta testikemikaalin poistuma voidaan määrittää.

11. Biologinen hajoaminen voidaan tavallisesti erottaa biosorptiosta tarkastelemalla huolellisesti poistuma-aikakäyrää, ja se voidaan yleensä vahvistaa biohajoamisen testillä käyttämällä akklimatisoitua inokulaattia yksiköstä, johon lisätään testikemikaalia.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

12. Testikemikaalin puhtauden, vesiliukoisuuden sekä haihtuvuus- ja adsorptio-ominaisuuksien on oltava tiedossa, jotta tulokset voidaan tulkita oikein. Haihtuvia ja liukenemattomia kemikaaleja ei tavallisesti voida testata ilman erityisiä varotoimia (katso lisäys 5). Kemiallisen rakenteen tai vähintään empiirisen kaavan on oltava tiedossa, jotta voidaan laskea teoreettiset arvot ja/tai tarkistaa mitatut parametriarvot, kuten teoreettinen hapenkulutus (ThOD), liuennut orgaaninen hiili (DOC) ja kemiallinen hapenkulutus (COD).

13. Tieto testikemikaalin toksisuudesta mikro-organismeille (katso lisäys 4) voi olla hyödyllinen soveltuvia testipitoisuuksia valittaessa ja olennainen matalien biohajoavuusarvojen oikean tulkinnan kannalta.

KYNNYSARVOT

14. Tämän pinta-aktiivisten aineiden primaarisen biologisen hajoamisen simulaatiotutkimuksen (toteamiskokeen) alkuperäisessä sovelluksessa spesifisen kemikaalin poistuman on oltava vähintään 80 prosenttia, jotta pinta-aktiivista ainetta voidaan markkinoida. Jos 80 prosentin arvoa ei saavuteta, tätä simulaatiotutkimusta (toteamiskoetta) voidaan soveltaa ja pinta-aktiivista ainetta voidaan markkinoida vain, jos yli 90 prosenttia spesifisestä kemikaalista poistuu. Yleensä ei ole epäselvää, läpäisevätkö kemikaalit testin, ja saatua poistumaprosenttia voidaan käyttää laskettaessa todennäköistä pitoisuutta ympäristössä, jota käytetään kemikaalin vaarallisuuden arvioinnissa. Tulokset noudattavat yleensä kaikki tai ei mitään -periaatetta. Useissa puhtaiden kemikaalien tutkimuksissa DOC:n poistumaprosentti oli yli 90 prosenttia yli kolmessa neljäsosassa tapauksista ja yli 80 prosenttia yli 90 prosentissa kemikaaleista, joissa ilmeni merkittävää biohajoavuutta.

15. Suhteellisen harvaa kemikaalia (esim. pinta-aktiivista ainetta) esiintyy jätevedessä tässä testissä käytettyinä pitoisuuksina (noin 10 mg C/l). Osa kemikaaleista saattaa olla inhiboivia näinä pitoisuuksina, kun taas toisten kemikaalien poistumiskinetiikka saattaa olla erilainen, kun pitoisuus on pieni. Hajoamista voidaan arvioida tarkemmin käyttämällä muunneltuja menetelmiä ja realistisen pieniä testikemikaalin pitoisuuksia, ja kerättyjen tietojen perusteella voidaan laskea kineettiset vakiot. Tarvittavia kokeellisia tekniikoita ei ole kuitenkaan vielä validoitu täysin eikä kineettisiä malleja, jotka kuvaavat biohajoamisreaktioita, ole määritetty (katso lisäys 7).

▼M4

VERTAILUKEMIKAALIT

16. Jotta voidaan varmistaa, että kokeellinen menetelmä suoritetaan oikein, testikemikaaleja tutkittaessa on hyvä testata välillä kemikaaleja, joiden käyttäytyminen on tiedossa. Tällaisia kemikaaleja ovat esimerkiksi adipiinihappo, 2-fenyylifenoli, 1-naftoli, difeenihappo ja 1-naftoehappo (9)(10)(11).

TESTITULOSTEN TOISTETTAVUUS

17. Simulaatiokokeiden tutkimuksista on laadittu paljon vähemmän raportteja kuin biohajoavuuskokeiden tutkimuksista. (Samanaikaisten) rinnakkaisnäytteiden toistettavuus on hyvä (10–15 %), kun testikemikaali on hajonnut vähintään 80-prosenttisesti, mutta vaihteluväli on suurempi, jos kemikaalin hajoavuus on heikompi. Lisäksi joiden rajatapausten osalta on kirjattu hyvinkin erilaisia tuloksia (kuten 10 % ja 90 %) eri ajankohtina 9-viikkoisen testijakson aikana.

18. Kahdella erityyppisellä laitteella saaduissa tuloksissa ei ole havaittu juurikaan eroa, mutta tietyt kemikaalit hajoavat kotitalousjätevedessä kattavammin ja yhtenäisemmin kuin OECD:n synteettisessä jätevedessä.

TESTAUSMENETELMÄN KUVAUS

Laite

Testijärjestelmä

19. Yhden testikemikaalin testijärjestelmään kuuluu testiyksikkö ja kontrolliyksikkö, mutta jos tehdään vain ominaisanalyysit (primaarinen biohajoaminen), tarvitaan pelkästään testiyksikkö. Yhtä kontrolliyksikköä voidaan käyttää useita testiyksikköjä varten huolimatta siitä, käytetäänkö testiyksiköissä samaa vai eri testikemikaaleja. Jos yksiköt yhdistetään (lisäys 3), jokaista testiyksikköä varten on oltava oma kontrolliyksikkö. Testijärjestelmä voi olla simuloitu aktiivilietelaitos, Husmannin yksikkö (lisäys 1, kuva 1) tai huokoinen astia (lisäys 1, kuva 2). Joka tapauksessa tarvitaan riittävän isot säiliöt tulo- ja poistovedelle sekä pumput, joilla annostellaan tulovesi joko testikemikaalin kanssa sekoitettuna tai erikseen.

20. Jokaisessa aktiivilietelaitoksessa on ilmastusastia, jonka tunnettu tilavuus on noin 3 litraa aktiivilietettä, ja erotusastia (toissijainen selkeytin), johon mahtuu noin 1,5 litraa. Tilavuuksia voidaan muuttaa hieman säätämällä erotusastian korkeutta. Astiat voivat olla erikokoisia, jos hydraulinen kuormitus on vastaava. Jos testihuoneen lämpötilaa ei voida pitää halutulla alueella, on suositeltavaa käyttää astioita, joissa on vesivaippa, ja lämpötilasäädeltyä vettä. Aktiiviliete kierrätetään paineilmapumpulla tai annostelupumpulla erottimesta ilmastusastiaan joko jatkuvasti tai säännöllisin väliajoin.

21. Huokoisten astioiden järjestelmään kuuluu huokoinen kartiokulmapohjainen sisäsylinteri, joka on vähän isommassa samanmuotoisessa astiassa, joka on tehty läpäisemättömästä muovista. Huokoiseen astiaan soveltuva materiaali on huokoinen polyeteeni, jonka suurin huokoskoko on 90 μm ja paksuus 2 mm. Liete erottuu käsitellystä orgaanisesta aineesta kulkeutuessaan huokoisen seinämän läpi. Poistovirrat keräytyvät rengasmaiseen tilaan, josta tapahtuu ylivuotoa keräämisastiaan. Selkeytymistä ei tapahdu, joten lietettä ei palauteta. Koko järjestelmä voidaan asentaa lämpösäädeltyyn vesihauteeseen. Huokoiset astiat tukkeutuvat, joten ylivuotoa voi tapahtua alkuvaiheissa. Jos näin käy, vaihda huokoinen sisäkappale. Ota ensin liete lapolla

▼M4

astiasta puhtaaseen ämpäriin ja poista tukkeutunut sisäkappale. Pyyhi läpäisemätön ulkosylinteri, asenna puhdas sisäkappale paikalleen ja pane liete takaisin astiaan. Kaavi tukkeutuneen sisäkappaleen reunoihin tarttunut liete huolellisesti ja siirrä se puhtaaseen astiaan. Puhdista tukkeutuneet astiat ensin hienolla vesisuihkulla, jotta jäljelle jäänyt liete poistuu, ja liota niitä ensin laimennetussa natriumhypokloriittiliuoksessa ja sitten vedessä. Huuhtele astiat lopuksi huolellisesti vedellä.

22. Kummankin järjestelmän ilmastusastioissa tapahtuvaan lietteen ilmastukseen on käytettävä soveltuvaa tekniikkaa, kuten sintrattuja kuutioita ja paineilmaa. Ilma puhdistetaan tarvittaessa kuljettamalla se soveltuvan suodattimen läpi ja pesemällä se. Järjestelmän läpi täytyy kulkea riittävästi ilmaa, jotta aerobiset olosuhteet säilyvät ja lietehiutaleet pysyvät suspendoituneina koko testin ajan.

Suodatinlaite tai sentrifugi

23. Kalvosuodatin, jonka huokoskoko on sopiva (aukon nimellishalkaisija 0,45 µm) ja joka adsorboi liukoisia orgaanisia kemikaaleja ja vapauttaa mahdollisimman vähän orgaanista hiiltä. Jos käytettävät suodattimet vapauttavat orgaanista hiiltä, poista orgaaninen hiili pesemällä suodattimet huolellisesti kuumalla vedellä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää sentrifugia, jolla voidaan saavuttaa 40 000 m/s^2:n kiihtyvyys.

Analyysilaitteet

24. Laite, joka tarvitaan seuraavien seikkojen määrittämiseen:

— DOC (liuennut orgaaninen hiili) ja TOC (orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus) tai COD (kemiallinen hapenkulutus)

— spesifinen kemikaali, jos tarpeen

— suspendoitunut kiintoaines, pH, happipitoisuus vedessä

— lämpötila, happamuus ja emäksisyys

— ammonium, nitriitti ja nitraatti, jos testi tehdään nitrifioivissa olosuhteissa.

Vesi

25. Vesijohtovesi, jossa DOC on alle 3 mg/l. Määritä emäksisyys, jos se ei ole tiedossa.

26. Deionisoitu vesi, jossa DOC on alle 2 mg/l.

Orgaaninen aine

27. Orgaanisena aineena voidaan käyttää synteettistä jätevettä, kotitalousjätevettä tai näiden yhdistelmää. On osoitettu (11)(14), että pelkän kotitalousjäteveden käyttö nostaa usein DOC:n poistumaprosenttia ja sallii jopa sellaisten kemikaalien poistumisen ja biologisen hajoamisen, jotka eivät hajoa biologisesti käytettäessä OECD:n synteettistä jätevettä. Lisäksi kotitalousjäteveden jatkuva tai ajoittainen lisääminen stabiloi usein aktiivilietettä, olennaisen tärkeä hyvä selkeytyvyys mukaan lukien. Niinpä kotitalousjäteveden käyttö on suositeltavaa. Mittaa jokaisen uuden orgaanisen aine-erän DOC- tai COD-pitoisuus. Orgaanisen aineen happamuuden tai emäksisyyden täytyy olla tiedossa. Orgaaniseen aineeseen voi olla tarpeen lisätä soveltuvaa puskuria (natriumvetykarbonaattia tai kaliumdivetyfosfaattia), jos happamuus tai emäksisyys on matala, jotta ilmastusastian pH on 7,5 ± 0,5 testin aikana. Lisättävän puskurin määrä ja lisäämisen ajankohta on päätettävä tapauskohtaisesti. Kun seoksia käytetään jatkuvasti tai ajoittaisesti, seoksen DOC-arvo (tai COD-arvo) on pidettävä suurin piirtein samana esimerkiksi laimentamalla seosta vedellä.

▼M4

Synteettinen jätevesi

28. Liuota yhteen litraan vesijohtovettä: 160 mg peptonia, 110 mg lihauutetta, 30 mg ureaa, 28 mg vedetöntä dikaliumvetyfosfaattia (K_2HPO_4), 7 mg natriumkloridia (NaCl), 4 mg kalsiumkloridihydraattia ($CaCl_2.2H_2O$), 2 mg magnesiumsulfaattiheptahydraattia. Tämä OECD:n synteettinen jätevesi on esimerkki, ja siinä tulovirtauksen DOC-pitoisuuden keskiarvo on noin 100 mg/l. Vaihtoehtoisesti voi käyttää muita koostumuksia, joiden DOC-pitoisuus on suunnilleen sama ja jotka ovat lähempänä oikeaa jätevettä. Jos tarvitaan tulovettä, jonka pitoisuus on pienempi, laimenna synteettistä jätevettä (esimerkiksi 1:1) vesijohtovedellä, jotta pitoisuudeksi saadaan noin 50 mg/l. Nitrifioivat organismit kasvavat hyvin tällaisessa laimeassa tulovedessä, ja laimennus on hyvä tehdä, jos aikomuksena on tutkia nitrifioivien jätevedenpuhdistamojen simulointia. Tätä synteettistä jätevettä voidaan valmistaa tislattuun veteen väkevöidyssä muodossa. Se säilyy viikon noin 1 °C:n lämpötilassa. Laimenna tarvittaessa vesijohtovedellä. (Tämä aine ei ole tyydyttävä, sillä esimerkiksi typpipitoisuus on hyvin korkea ja hiilipitoisuus suhteellisen matala, mutta parempia ehdotuksia ei ole tehty, lukuun ottamatta fosfaatin lisäämistä puskurina ja peptonin lisäämistä).

Kotitalousjätevesi

29. Käytä tuoretta selkeytettyä jätevettä, jota kerätään päivittäin puhdistamosta, johon tulee pääasiassa kotitalousjätevettä. Jätevesi kerätään ennen primaarista sedimentaatiota primaarisen sedimentaatioaltaan ylivuotokanavasta tai aktiivilietelaitoksen syötöstä, eikä siinä saa juurikaan olla karkeita hiukkasia. Jätevettä voidaan käyttää, kun sitä on säilytetty usea päivä (ei kuitenkaan yleensä yli seitsemän päivää) noin 4 °C:n lämpötilassa, jos voidaan todistaa, että DOC (tai COD) ei ole laskenut merkittävästi (alle 20 %) säilytyksen aikana. Jotta järjestelmän häiriöitä voidaan välttää, jokaisen uuden erän DOC (tai COD) on säädettävä ennen käyttöä soveltuvaan vakioarvoon esimerkiksi vesijohtovedellä laimentamalla.

Aktiiviliete

30. Ota aktiivilietettä ymppäystä varten asianmukaisesti toimivan jätevedenpuhdistamon ilmastussäiliöstä tai laboratoriolaitoksesta, johon syötetään pääosin kotitalouksista tulevaa jätevettä.

Testikemikaalin kantaliuokset

31. Jos kemikaalin liukoisuus on riittävä, valmista kantaliuokset, joiden pitoisuus on soveltuva (esim. 1–5 g/l), deionisoituun veteen tai synteettisen jäteveden mineraaleihin. (Liukenemattomat ja haihtuvat kemikaalit, katso lisäys 5.) Määritä kantaliuoksen DOC ja orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) ja toista mittaukset jokaiselle uudelle erälle. Jos DOC- ja TOC-arvon ero on yli 20 prosenttia, tarkista testikemikaalin vesiliukoisuus. Varmista, että saanto on riittävän hyvä (tavallisesti > 90 prosenttia on odotettavissa), vertaamalla nimellisarvoon DOC-arvoa tai testikemikaalin pitoisuutta, joka on mitattu kantaliuoksen ominaisanalyysilla. Varmista etenkin dispersioiden osalta, voidaanko DOC-arvoa käyttää analyyttisenä parametrina vai voidaanko käyttää ainoastaan testikemikaalikohtaista analyysimenetelmää. Näytteet on sentrifugoitava, jos kyseessä on dispersio. Mittaa jokaisen uuden erän DOC, COD tai testikemikaali ominaisanalyysilla.

▼M4

32. Määritä kantaliuoksen pH. Äärimmäiset arvot viittaavat siihen, että kemikaalin lisääminen saattaa vaikuttaa testijärjestelmän aktiivisuuteen pH-arvoon. Jos näin käy, neutraloi kantaliuos pienillä määrillä epäorgaanista happoa tai emästä, kunnes pH on 7 ± 0,5, mutta vältä testikemikaalin saostumista.

MENETTELY

33. Menettely kuvataan aktiivilietelaitoksia varten. Sitä on muokattava hieman, jos käytössä on huokoisten astioiden järjestelmä.

Siirrosaineen valmistelu

34. Testijärjestelmään lisätään testin alussa siirrosaineena aktiivilietettä tai siirrosainetta, joka sisältää pienen määrän mikro-organismeja. Pidä siirrosaine ilmastettuna huoneenlämmössä käyttöön asti ja käytä se 24 tunnin kuluessa. Jos käytetään aktiivilietettä, ota aktiivilietenäyte tehokkaan biologisen jätevedenpuhdistamon ilmastussäiliöstä tai laboratoriopuhdistamosta, johon tulee lähinnä kotitalousjätevettä. Jos tarkoituksena on simuloida nitrifioivia olosuhteita, ota lietettä nitrifioivasta jätevedenpuhdistamosta. Määritä suspendoituneen kiintoaineksen pitoisuus ja väkevöi liete tarvittaessa selkeyttämällä, jotta testijärjestelmään lisättävä tilavuus on mahdollisimman pieni. Varmista, että kuiva-aineen alkupitoisuus on noin 2,5 g/l.

35. Jälkimmäisessä tapauksessa inokulaattina käytetään 2–10 ml/l biologisen jätevedenpuhdistamon poistovettä. Jotta saadaan mahdollisimman monta eri bakteerilajia, voi olla hyvä lisätä eri lähteistä, kuten esimerkiksi pintavedestä, saatuja inokulaatteja. Tällöin aktiiviliete kehittyy ja kasvaa testijärjestelmässä.

Orgaanisen aineen annostelu

36. Varmista, ettei tulo- ja poistoveden säiliössä tai tuloveden säiliöistä tulevissa ja poistoveden säiliöön johtavissa putkissa ole mikrobikasvustoja puhdistamalla ne huolellisesti ennen testiä ja testin aikana. Kokoa testijärjestelmät huoneessa, jonka lämpötilaa säädellään (tavallisesti 20–25 °C) tai käytä testiyksiköitä, joissa on vesivaippa. Valmista riittävä määrä tarvittavaa orgaanista ainetta (kohdat 27–29). Täytä ilmastusastia ja erotin aluksi orgaanisella aineella ja lisää inokulaatti (kohdat 34 ja 35). Aloita ilmastus siten, että liete pysyy suspensiossa ja aerobisessa tilassa, ja aloita tuloveden annostelu ja selkeytetyn lietteen kierrätys. Annostele orgaanista ainetta säiliöistä testi- ja kontrolliyksiköiden ilmastusastioihin (kohdat 20 ja 21) ja kerää poistovedet vastaaviin säiliöihin. Jotta hydraulinen retentioaika on normaali eli 6 h, orgaanista ainetta pumpataan nopeudella 0,5 l/h. Varmista nopeus mittaamalla päivittäin annosteltu orgaaninen aine sen perusteella, paljonko säiliöissä olevan aineen tilavuus on pienentynyt. Toinen annostelutapa on tarpeen, jos halutaan määrittää kemikaalien ajoittaisen vapautumisen tai äkkikuormituksen vaikutuksia.

37. Jos orgaanista ainetta valmistetaan päivää pidemmäksi ajaksi, se on jäähdytettävä noin 4 °C:ssä tai säilytettävä muulla soveltuvalla tavalla, jotta mikrobien kasvu ja biologinen hajoaminen voidaan estää testiyksiköiden ulkopuolella (kohta 29). Jos käytetään synteettistä jätevettä, voidaan valmistaa väkevöitetty kantaliuos (esim. kymmenen kertaa normaalia väkevämpi, kohta 28), jota voidaan säilyttää noin 4 °C:ssa. Tämä kantaliuos voidaan sekoittaa hyvin sopivaan määrään vesijohtovettä ennen käyttöä tai se voidaan pumpata suoraan samalla, kun sopiva määrä vesijohtovettä pumpataan erikseen.

▼M4

Testikemikaalin annostelu

38. Lisää sopiva määrä testikemikaalin kantaliuosta (kohta 31) tuloveden säiliöön tai annostele se suoraan ilmastusastiaan erillisellä pumpulla. Tuloveden testipitoisuuden keskiarvon on normaalisti oltava 10–20 mg/l (DOC), eikä suurin pitoisuus saa olla yli 50 mg/l. Jos testikemikaalin vesiliukoisuus on alhainen tai toksisia vaikutuksia on odotettavissa, laske pitoisuus arvoon 5 mg/l DOC tai jopa sen alle, mutta vain silloin, jos soveltuva ominaisanalyysi on käytettävissä ja sellainen tehdään (dispergoidut testikemikaalit, jotka liukenevat huonosti veteen, voidaan lisätä erityisillä annostelumenetelmillä, katso lisäys 5).

39. Aloita testikemikaalin lisääminen, kun järjestelmän toiminta on vakiintunut ja se poistaa DOC:ta orgaanisesta aineesta tehokkaasti (noin 80 %). Ennen testikemikaalin lisäämistä on tärkeää tarkistaa, että kaikki yksiköt toimivat yhtä tehokkaasti. Jos näin ei ole, yleensä auttaa, kun lietteet sekoitetaan keskenään ja jaetaan uudelleen yhtä suuriin osiin eri yksiköihin. Kun käytössä on aktiivilieteinokulaatti (noin) 2,5 g/l (kuivapaino), testikemikaalia voidaan lisätä testin alusta saakka, sillä suurenevien määrien lisäämisessä suoraan on se etu, että aktiiviliete saattaa adaptoitua testikemikaaliin paremmin. Huolimatta siitä, millä tavalla testikemikaalia lisätään, virtausnopeus ja/tai säiliön tai säiliöiden tilavuudet on suositeltavaa mitata säännöllisin väliajoin.

Aktiivilietteen käsittely

40. Aktiivilietteen kiintoaineksen pitoisuus stabiloituu tavallisesti raja-arvojen sisään testin kuluessa käytetystä inokulaatista huolimatta. Alue on 1–3 g/l (kuivapaino) orgaanisen aineen laadun ja pitoisuuden, käyttöolosuhteiden, mikro-organismien luonteen ja testikemikaalin vaikutuksen mukaan.

41. Määritä suspendoitunut kiintoaines ilmastusastioissa vähintään kerran viikossa ja heitä ylimääräinen liete pois, jotta pitoisuus pysyy alueella 1–3 g/l (kuivapaino), tai kontrolloi, että lietteen iän keskiarvo pysyy vakiona eli yleensä 6–10 päivää. Jos lietteen retentioajaksi valitaan esimerkiksi 8 päivää, poista joka päivä 1/8 aktiivilietteen ilmastusastiassa olevasta tilavuudesta ja hävitä se. Toista sama päivittäin tai käytä automaattista jaksoittaisesti toimivaa pumppua, jos mahdollista. Suspendoituneen kiintoaineksen pitoisuuden pitäminen vakiona tai tarkoin rajatulla alueella ei pidä vakiona lietteen retentioaikaa (SRT). Se on muuttuja, joka määrittää testikemikaalin pitoisuusarvon poistovedessä.

42. Poista testin aikana vähintään kerran päivässä ilmastusastian ja erotusastian seiniin tarttunut liete, jotta se suspendoituu uudelleen. Estä biokalvon kasvu tarkastamalla ja puhdistamalla kaikki putket ja letkut säännöllisesti. Kierrätä selkeytetty liete erotusastiasta ilmastusastiaan mieluiten jaksoittaisella pumppauksella. Huokoisia astioita käytettäessä kierrätystä ei tehdä, mutta varmista, että puhtaat sisäastiat ovat paikallaan, ennen kuin astian tilavuus nousee merkittävästi (kohta 21).

43. Husmannin yksiköissä lietteen selkeytyminen voi olla heikkoa ja lietettä voi hävitä. Tilanteen voi korjata käyttämällä testi- ja kontrolliyksiköissä rinnakkain yhtä tai useaa seuraavista menetelmistä:

— tuoretta lietettä tai hiutaloittamisainetta (esimerkiksi 2 ml/astia, 50 g/l $FeCl_3$) voidaan lisätä säännöllisin väliajoin, kuten kerran viikossa, mutta varmista, ettei $FeCl_3$ aiheuta testikemikaalin reaktioita tai saostumista

▼M4

— paineilmapumpun tilalle voidaan vaihtaa peristalttinen pumppu, jolloin voidaan käyttää lietteen kierrätysvirtausta, joka vastaa suunnilleen tuloveden virtausta, ja selkeytettyyn lietteeseen voi kehittyä anaerobinen alue (paineilmapumpun geometria rajoittaa palautetun lietteen vähimmäisvirtausnopeuden noin 12-kertaiseksi tulovirtaukseen verrattuna)

— lietettä voidaan pumpata jaksoittaisesti erottimesta ilmastusastiaan (esim. 5 minuutin pumppaus 2,5 tunnin välein, kun kierrätetään 1–1,5 l/h)

— vaahtoamisen aiheuttamaa poistumista voidaan estää käyttämällä myrkytöntä vaahtoutumatonta ainetta (kuten silikoniöljyä), jonka pitoisuus on pienin mahdollinen

— ilmaa voidaan kuljettaa erottimessa olevan lietteen läpi lyhyinä sykäyksinä (esim. 10 sekuntia kerran tunnissa)

— orgaanista ainetta voidaan annostella jaksoittaisesti ilmastusastiaan (esim. 3–10 minuuttia kerran tunnissa).

Näytteenotto ja näytteiden analyysi

44. Mittaa säännöllisin väliajoin ilmastusastioissa olevan aktiivilietteen liuenneen hapen pitoisuus, lämpötila ja pH-arvo. Varmista, että happea on aina riittävästi (> 2 mg/l) ja että lämpötila pysyy vaaditulla alueella (yleensä 20–25 °C). Pidä pH arvossa 7,5 ± 0,5 annostelemalla ilmastusastiaan tai tuloveteen pieniä määriä epäorgaanista emästä tai happoa tai nostamalla orgaanisen aineen puskurointitehoa (katso kohta 27). Kun nitrifikaatiota tapahtuu, syntyy happoa. Kun 1 mg typpeä hapettuu, syntyvä määrä vastaa noin 7:ää mg CO_3:ta. Mittaustiheys määräytyy mitattavan parametrin ja järjestelmän vakauden mukaan ja voi vaihdella päivästä viikkoon.

45. Mittaa kontrolli- ja testiastioiden tuloveden DOC tai COD. Mittaa testikemikaalin pitoisuus testitulovirrasta ominaisanalyysillä tai arvioi se kantaliuoksen pitoisuuden (kohta 31), käytetyn tilavuuden ja testiyksikköön annostellun lietemäärän perusteella. Testikemikaalin pitoisuuden laskeminen on suositeltavaa, sillä se vähentää pitoisuustietojen vaihtelua.

46. Ota kerätystä poistovedestä soveltuvat näytteet (esim. 24 h:n komposiitit) ja suodata ne sellaisen kalvon läpi, jonka huokoskoko on 0.45 μm, tai sentrifugoi kiihtyvyydellä 40 000 m/s^2 noin 15 minuutin ajan. Sentrifugointia käytetään, jos suodattaminen on hankalaa. Mittaa lopullinen biohajoaminen määrittämällä DOC tai COD vähintään kaksi kertaa sekä tarvittaessa primaarinen biohajoaminen testikemikaalin ominaisanalyysilla.

47. COD-arvon käytöstä voi seurata analyyttisiä ongelmia, jos pitoisuus on pieni, joten on suositeltavaa käyttää tarpeeksi suurta testipitoisuutta (noin 30 mg/l). Jos kemikaali on voimakkaasti adsorboiva, adsorboituneen kemikaalin määrä lietteessä on suositeltavaa mitata testikemikaalikohtaisella analyysimenetelmällä.

48. Näytteenottotiheys määräytyy testin odotetun keston mukaan. Suositeltu tiheys on kolmesti viikossa. Kun yksiköt toimivat tehokkaasti, odota testikemikaalin lisäämisen jälkeen 1–6 viikkoa, jotta tasapainotila saavutetaan. Tasannevaiheessa (kohta 59), joka kestää yleensä 3 viikkoa, on suositeltavaa määrittää vähintään 15 kelvollista arvoa testituloksen arviointia varten. Testi voidaan lopettaa, kun poistumisaste on riittävä (esim. > 90 %) ja käytettävissä ovat nämä 15 arvoa, jotka edustavat joka päivä 3 viikon ajan tehtyjä analyyseja. Yleensä testin ei ole tarkoitus kestää yli 12:ta viikkoa testikemikaalin lisäämisen jälkeen.

▼M4

49. Jos liete nitrifioituu ja jos testikemikaalin vaikutusta nitrifikaatioon halutaan tutkia, analysoi ammonia ja/tai nitriitti ja nitraatti testi- ja kontrolliyksiköiden poistoveden näytteistä vähintään kerran viikossa.

50. Kaikki analyysit on tehtävä mahdollisimman pian. Tämä koskee erityisesti typen määritystä. Jos analysointia on lykättävä, säilytä näytteitä täysissä ja tiiviisti suljetuissa pulloissa pimeässä tilassa, jonka lämpötila on noin 4 °C. Jos näytteitä on säilytettävä yli 48 h, säilytä ne pakastamalla, hapottamalla (esim. 10 ml/l rikkihappoliuosta, jonka pitoisuus on 400 g/l) tai lisäämällä soveltuvaa myrkyllistä ainetta (esim. 20 ml/l elohopea(II)kloridiliuosta, jonka pitoisuus on 10 g/l). Varmista, ettei säilömistapa vaikuta analyysin tuloksiin.

Testiyksiköiden yhdistäminen

51. Jos yksiköt yhdistetään pareiksi (lisäys 3), vaihda päivittäin sama määrä aktiivilietettä (150–1 500 ml, kun ilmastusastiassa on 3 litraa nestettä) testiyksikön ja sen kontrolliyksikön ilmastusastioiden välillä. Jos testikemikaali adsorboituu voimakkaasti lietteeseen, vaihda vain erottimien kelluva neste. Käytä kummassakin tapauksessa korjauskerrointa, kun lasket testituloksia (kohta 55).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

52. Laske testikemikaalin DOC- tai COD-poistumaprosentti jokaisen ajoitetun arvioinnin osalta käyttämällä kaavaa:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

jossa

D_t = DOC- tai COD-poistumaprosentti aikana t

C_s = testikemikaalista johtuva DOC tai COD tulovedessä, mieluiten kantaliuoksesta arvioituna (mg/l)

E = testipoistovirrasta mitattu DOC- tai COD-arvo aikana t (mg/l)

E_o = kontrollipoistovirrasta mitattu DOC- tai COD-arvo aikana t (mg/l)

53. Orgaanisen aineen DOC- tai COD-poistumisaste kontrolliyksikössä auttaa arvioimaan aktiivilietteen biologista hajoamistoimintaa testin aikana. Laske poistumaprosentti seuraavan kaavan avulla:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

jossa

D_B = kontrolliyksikön orgaanisen aineen DOC- tai COD-poistumaprosentti aikana t

C_M = DOC tai COD kontrollitulovirran orgaanisessa aineessa (mg/l)

▼M4

Orgaanisen aineen ja testikemikaalin aiheuttaman DOC- tai COD-poistumaprosentin testiyksikössä voi haluttaessa laskea kaavalla:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

jossa

D_T = testitulovirran DOC- tai COD-poistumaprosentti yhteensä

C_T = testitulovirran DOC tai COD yhteensä tai laskettuna kantaliuoksista (mg/l)

54. Laske testikemikaalin poistuma, jos se on mitattu ominaisanalyysillä jokaisella arviointikerralla, seuraavalla kaavalla:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

jossa

D_{ST} = testikemikaalin primaarinen poistumaprosentti aikana t

S_i = testikemikaalin mitattu tai arvioitu pitoisuus testitulovirrassa (mg/l)

S_e = testikemikaalin mitattu pitoisuus testipoistovirrassa aikana t (mg/l)

55. Jos yksiköt oli yhdistetty, kompensoi lietteen vaihtamisen aiheuttama testikemikaalin laimentuminen ilmastusastiassa korjauskertoimella (katso lisäys 3). Jos hydraulisen retentioajan keskiarvo oli 6 h ja puolet ilmastusastian aktiivilietetilavuudesta vaihdettiin, määritetyt päivittäiset poistuma-arvot (D_t, kohta 52) on korjattava seuraavalla kaavalla, jotta saadaan testikemikaalin todellinen poistuma-aste, D_{tc}:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Testitulosten ilmaiseminen

56. Esitä poistumaprosentti D_t (tai D_{tc}) ja D_{st}, jos käytettävissä, graafisesti ajan funktiona (katso lisäys 2). Testikemikaalin (sellaisenaan tai COD:na) poistumakäyrän muodosta voidaan tehdä joitakin päätelmiä poistumaprosessista.

Adsorptio

57. Jos testikemikaalin DOC-poistuma on korkea testin alusta saakka, testikemikaali poistuu todennäköisesti adsorboitumalla aktiivilietteen kiintoainekseen. Tämän voi todistaa määrittämällä adsorboituneen testikemikaalin ominaisanalyysillä. Adsorboituvien kemikaalien DOC-poistuma ei yleensä pysy korkeana koko testin ajan. Tavallisesti poistumisaste on korkea aluksi ja laskee sitten hiljalleen tasapainoarvoon. Jos adsorboituva testikemikaali aiheutti kuitenkin tavalla tai toisella mikrobipopulaation adaptoitumista, testikemikaalin DOC-poistuma nousee myöhemmin ja saavuttaa korkean tasannearvon.

▼M4

Lag-vaihe

58. Samoin kuin staattisissa seulontatesteissä, monet testikemikaalit vaativat lag-vaiheen eli latenssiajan, ennen kuin biologinen hajoaminen on täydellistä. Lag-vaiheen aikana hajoavat bakteerit sopeutuvat tai adaptoituvat eikä testikemikaalia poistu juuri lainkaan. Sen jälkeen alkaa näiden bakteerien alkukasvu. Tämä vaihe loppuu ja hajoamisvaiheen katsotaan alkavan, kun noin 10 prosenttia testikemikaalin alkuperäisestä määrästä on poistunut (adsorptio huomioiden, jos sitä tapahtuu). Lag-vaihe on usein erittäin vaihteleva, ja sen toistettavuus on huono.

Tasannevaihe

59. Jatkuvassa testissä poistumakäyrän tasannevaihe on vaihe, jossa hajoaminen on maksimaalista. Tasannevaiheen on kestettävä vähintään 3 viikkoa, ja sen aikana on mitattava noin 15 kelvollista arvoa.

Testikemikaalin keskimääräinen poistumisaste

60. Laske testikemikaalin tasannevaiheen poistumisarvojen (D_t) keskiarvo. Kun se pyöristetään lähimpään kokonaislukuun (1 %), saadaan testikemikaalin poistumisaste. On myös suositeltavaa laskea keskiarvon 95 prosentin luottamusväli.

Orgaanisen aineen poistuminen

61. Esitä kontrolliyksikön orgaanisen aineen DOC- tai COD-poistumaprosentti (D_B) graafisesti ajan funktiona. Ilmoita poistumisasteen keskiarvo samoin kuin testikemikaalin osalta (kohta 60).

Viite biologisesta hajoamisesta

62. Jos testikemikaali ei adsorboidu merkittävästi aktiivilietteeseen ja poistumakäyrän muoto vastaa tyypillistä biologisen hajoamisen käyrää, jossa näkyvät lag-, hajoamis- ja tasannevaihe (kohdat 58 ja 59), mitattua poistumaa voidaan pitää biologisesta hajoamisesta johtuvana. Jos poistuminen on aluksi runsasta, simulaatiotutkimuksella ei voida erottaa biologisia ja abioottisia eliminaatioprosesseja. Jos näin käy tai jos biologisesta hajoamisesta on muuten epävarmuutta (esim. haihtumista tapahtuu), analysoi adsorboituneet testikemikaalit tai testaa biologista hajoavuutta tilastotieteellisillä lisätesteillä niiden parametrien perustella, jotka viittaavat selvästi biologisiin prosesseihin. Tällaisia testejä ovat hapen kulutuksen menetelmät (tämän liitteen luvut C.4 D, E ja F (6)), hiilidioksidin tuotannon mittaustesti (tämän liitteen luku C.4 C (6)) ja ISO Headspace -menetelmä (18) käyttämällä simulaatiotutkimuksessa altistunutta inokulaattia. Jos sekä DOC-poistuma että spesifisen kemikaalin poistuma on mitattu, poistumaprosenttien merkittävät erot (ensimmäinen on matalampi kuin jälkimmäinen) viittaavat siihen, että poistovedessä on orgaanisia välituotteita, jotka saattavat hajota heikommin kuin lähtökemikaali.

Testitulosten luotettavuus

63. Inokulaatin tavanomaisesta biohajoamiskäyttäytymisestä saadaan tietoa, jos orgaanisen aineen poistumisaste (kohta 53) kontrolliyksikössä määritetään. Testi on luotettava, jos DOC- tai COD-poistumisaste kontrolliyksikössä tai -yksiköissä on > 80 prosenttia kahden viikon kuluttua eikä epätavallisia havaintoja ole tehty.

▼M4

64. Jos käytettiin helposti biohajoavaa vertailukemikaalia, biologisen hajoavuuden asteen (D_t, kohta 52) pitäisi olla yli 90 prosenttia.

65. Jos testi tehdään nitrifioivissa olosuhteissa, keskimääräisen ammoniumtypen pitoisuuden poistovesissä pitäisi olla < 1 mg/l ja nitriittitypen < 2 mg/l.

66. Jos nämä kriteerit (kohdat 63–65) eivät täyty, toista testi käyttämällä inokulaattia, joka on peräisin toisesta lähteestä, testaa vertailukemikaali ja tarkista kaikki kokeelliset menetelmät.

Testiraportti

67. Testiraportissa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— tunnistetiedot

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä.

Testiolosuhteet:

— testijärjestelmän tyyppi, mahdolliset haihtuvien ja liukenemattomien kemikaalien testausta varten tehdyt muutokset

— orgaanisen aineen tyyppi

— teollisuusjäteveden osuus jätevedestä ja sen ominaisuudet, jos tiedossa

— inokulaatti, ominaisuudet ja näytteenottopaikka tai -paikat, pitoisuus ja mahdollinen esikäsittely

— testikemikaalin kantaliuos: DOC- ja TOC-pitoisuus, valmistustapa, mahdollinen suspensio, käytetty testipitoisuus, syyt jos DOC ei ole alueella 10–20 mg/l, lisäystapa, ensimmäisen lisäyksen päivämäärä, mahdolliset muutokset

— lietteen keskimääräinen ikä ja keskimääräinen hydraulinen retentioaika, lietteen poistumatapa, tilavuuden kasvun estämistavat, lietteen häviäminen jne.

— käytetyt analyyttiset tekniikat

— testilämpötila

— lietteen tilavuuden kasvun ominaisuudet, lietteen tilavuusindeksi (SVI), kiinteiden aineiden osuus liuoksessa (MLSS)

— mahdolliset poikkeamat standardimenetelmistä ja olosuhteet, jotka ovat voineet vaikuttaa tuloksiin.

Testitulokset:

— kaikki mitatut tiedot (DOC, COD, ominaisanalyysit, pH, lämpötila, happipitoisuus, suspendoitunut kiintoaines, N-kemikaalit, mikäli aiheellista)

— kaikki lasketut D_t- (tai D_{tc}-), D_B- ja D_{St}-arvot taulukoituina sekä poistumakäyrät

— lag- ja tasannevaiheen tiedot, testin kesto, testikemikaalin ja kontrolliyksikön orgaanisen aineen poistumisaste sekä tilastotiedot ja lausumat biologisesta hajoavuudesta ja testin luotettavuudesta

— tulosten pohdinta.

▼M4

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Swisher RD (1987). ”Surfactant Biodegradation”, 2. painos. Marcel Dekker Inc. New York, s. 1085.

2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No. 49: 698–706.

3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909–915.

5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

6) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys.

7) Tämän liitteen luku C.12 Biologinen hajoaminen – modifioitu SCAS-testi.

8) Tämän liitteen luku C.19 Maa-aineksiin ja viemärilietteeseen sovellettavan adsorptiokertoimen (K_{OC}) määritys korkean suorituskyvyn nestekromatografialla.

9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157–173.

10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45–55.

11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. s. 113–138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

12) ISO 11733 (1995; tarkistettu 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium – activated sludge simulation test.

13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33–48.

14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340–343.

15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753–758.

16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

17) Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. s. 91–98 ISBN 011 751661 9.

18) ISO 14593 (1998). Water Quality – Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

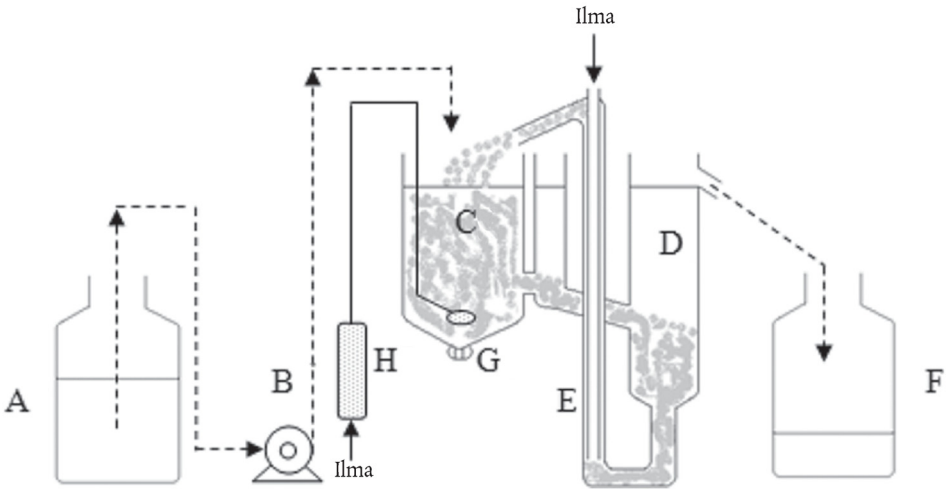
▼**M4**

Lisäys 1

Kuva 1

Biologisen hajoamisen määrityslaitteisto

Husmannin yksikkö



A. Säiliö

B. Annostelupumppu

C. Ilmastuskammio (3 l)

D. Selkeytysastia

E. Paineilmapumppu

F. Keräämisastia

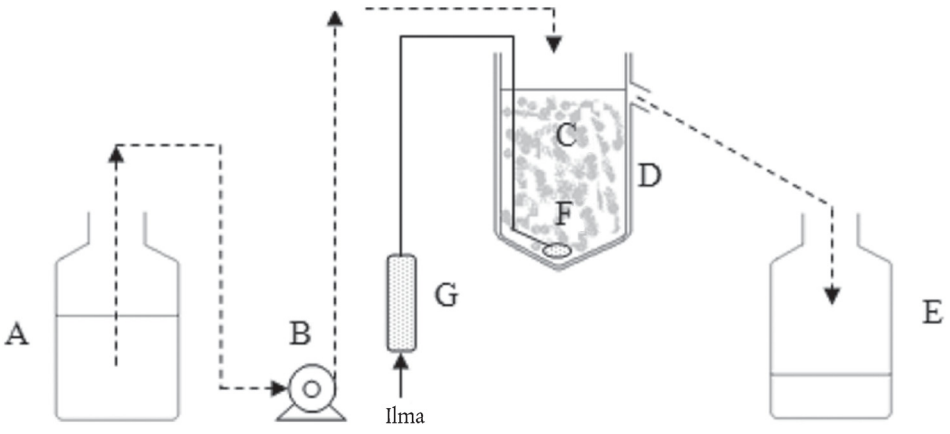
G. Ilmastin

H. Ilmavirtausmittari

Kuva 2

Biologisen hajoamisen määrityslaitteisto

Huokoinen astia



A. Säiliö

B. Annostelupumppu

C. Huokoinen ilmastusastia

D. Ulompi läpäisemätön astia

E. Keräämisastia

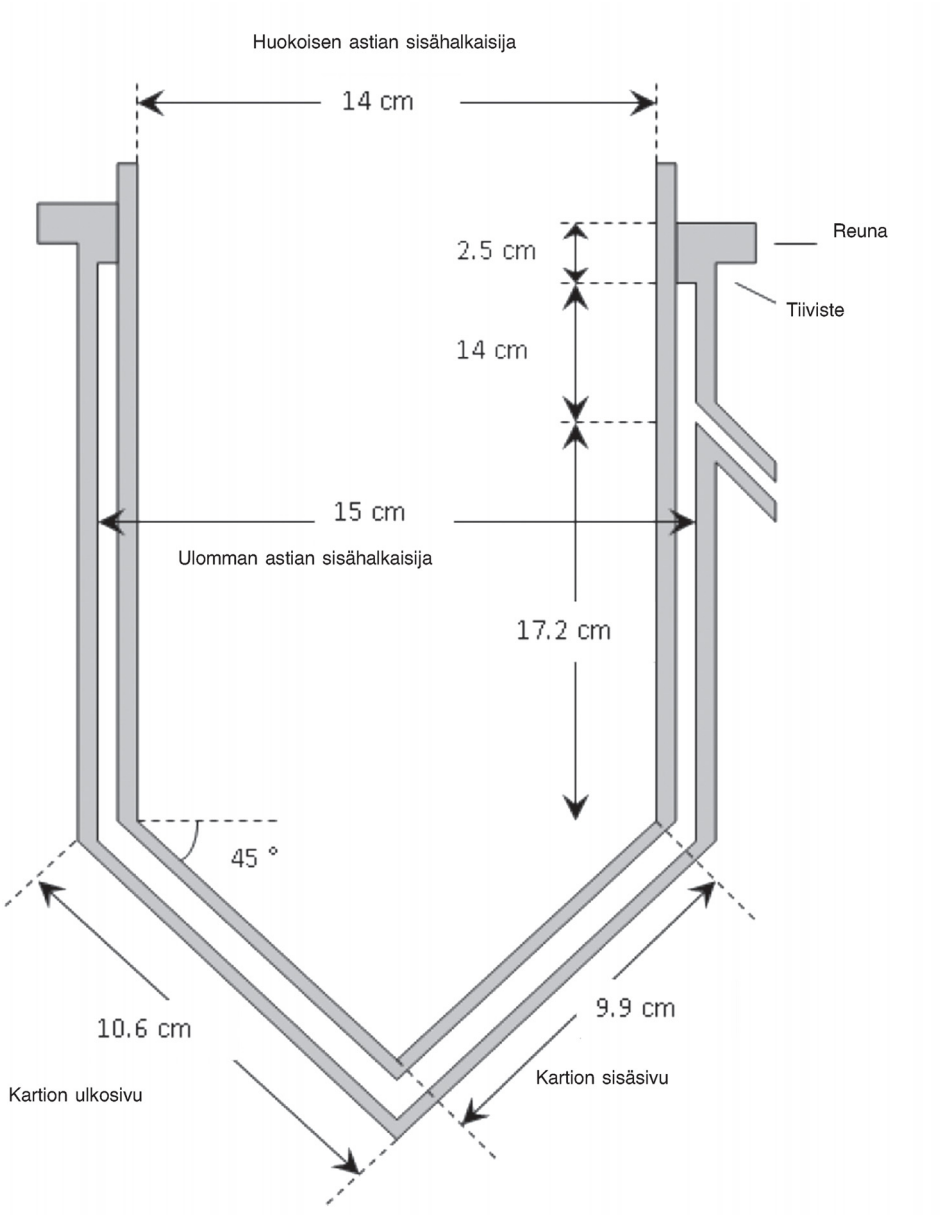
F. Diffuusori

G. Ilmavirtausmittari

▼**M4**

Kuva 3

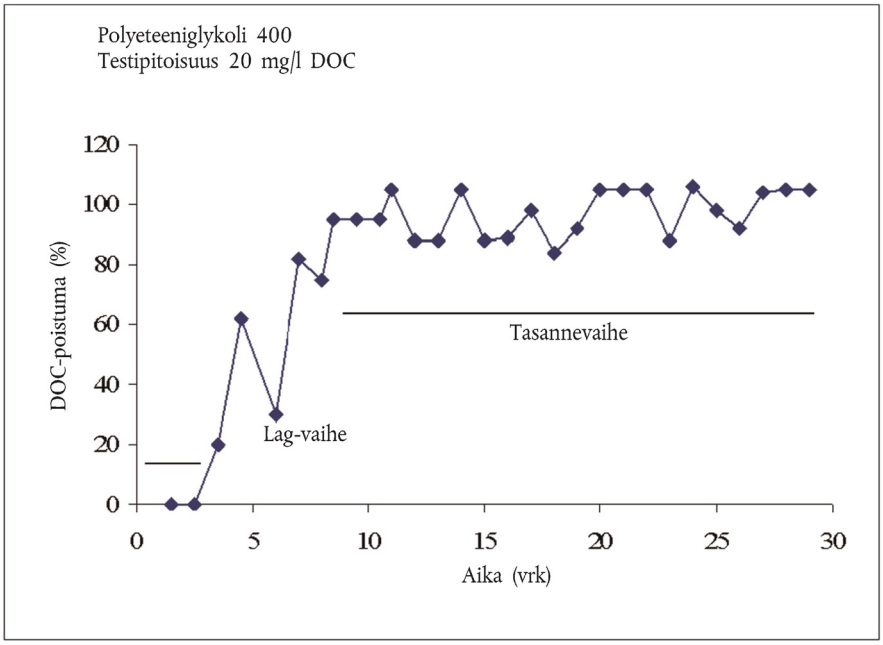
Kolmen litran huokoisen ilmastusastian yksityiskohdat



▼**M4**

Lisäys 2

Esimerkki poistumakäyrästä



▼**M4**

Lisäys 3

[INFORMATIIVINEN]

TESTIYKSIKÖIDEN YHDISTÄMINEN

Koska pyrkimyksenä oli yhtäläistää lietteiden mikrobipopulaatiot testiyksikössä, johon tulee jätevettä ja testikemikaalia, sekä kontrolliyksikössä, johon tulee vain jätevettä, lietettä alettiin vaihtaa yksiköstä toiseen päivittäin (1). Tätä menetelmää kutsutaan yhdistämiseksi ja pareiksi yhdistetyiksi yksiköiksi. Yhdistämistä tehtiin alun perin Husmannin aktiivilieteyksiköissä, mutta sitä on tehty myös huokoisia astioita käytettäessä (2)(3). Yhdistämättömien ja yhdistettyjen yksiköiden tuloksissa ei havaittu suuria eroja niin Husmannin yksiköissä kuin huokoisissa astioissakaan, joten yksiköiden yhdistämiseen on turha käyttää aikaa ja nähdä vaivaa.

Kun lietettä vaihdetaan, poistuma voi vaikuttaa merkittävältä, sillä osa testikemikaalista siirretään ja testikemikaalin pitoisuudet testi- ja kontrollipoistovirrassa yhtäläistyvät. Siksi on käytettävä korjauskertoimia, jotka määräytyvät vaihdetun osuuden ja keskimääräisen hydraulisen retentioajan mukaan. Laskennasta on julkaistu lisätietoa (1).

Laske korjattu DOC- tai COD-poistumisaste seuraavalla kaavalla:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\%$$

jossa

D_{tc} = korjattu DOC- tai COD-poistumaprosentti

D_t = määritetty DOC- tai COD-poistumaprosentti

a = vaihdettu osuus aktiivilieteyksiköiden tilavuudesta

r = hydraulisen retentioajan keskiarvo (h)

Jos esimerkiksi puolet ilmastussäiliön tilavuudesta vaihdetaan (a = 0,5) ja hydraulisen retentioajan keskiarvo on 6 h, korjauskaava on seuraava:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131–1135.

2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. s. 113–138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Lisäys 4

AKTIIVILIETTEEN INHIBITION ARVIOINTI

Käsittely testikemikaaleilla

1. On mahdollista, että kemikaali (tai jätevesi) ei hajoa tai poistu simulaatiotutkimuksessa, ja sillä saattaa jopa olla inhibitiovaikutus lietteen mikro-organismeihin. Toiset kemikaalit hajoavat biologisesti, kun pitoisuus on pieni, mutta ovat inhiboivia, kun pitoisuus on suuri (hormeesi). Inhibitiovaikutukset saattavat paljastua alkuvaiheessa tai ne voidaan määrittää toksisuustestillä, jossa käytetään samaa tai identtistä inokulaattia kuin simulaatiotutkimuksessa (1). Tällaisia menetelmiä ovat hapenkulutuksen estäminen (tämän liitteen luku C.11 (2) ja ISO 8192(3)) tai lietteen organismien kasvun estäminen (ISO 15522 (4)).

2. Simulaatiotutkimuksessa mahdolliset inhibitiovaikutukset ilmenevät siinä, että testiastian ja kontrolliastian poistoveden liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) tai kemiallisen hapenkulutuksen (COD) ero on suurempi kuin testikemikaalin mukana lisätty DOC. Toisin ilmaistuna käsiteltävän orgaanisen aineen DOC-poistumaprosentti (ja biokemiallinen hapentarve eli BOD, kemiallinen hapenkulutus eli COD ja/tai NH^{+}_{4}) laskee testikemikaalin vaikutuksesta. Jos näin käy, testi on toistettava siten, että testikemikaalin pitoisuutta lasketaan, kunnes saavutetaan taso, jossa inhibitiota ei tapahdu. Pitoisuutta voi olla hyvä laskea vielä lisää, kunnes testikemikaali hajoaa biologisesti. Jos testikemikaali (tai jätevesi) kuitenkin vaikuttaa prosessiin haitallisesti kaikilla testatuilla pitoisuuksilla, kemikaalia on luultavasti vaikeaa tai mahdotonta käsitellä biologisesti, mutta testi voi kuitenkin olla hyvä toistaa käyttämällä aktiivilietettä, joka on peräisin toisesta lähteestä, ja/tai totuttaa liete asteittaisesti.

3. Jos taas testikemikaali poistuu biologisesti simulaatiotutkimuksen ensimmäisessä yrityksessä, pitoisuutta on lisättävä, jos kemikaalin mahdollisen inhibitiovaikutuksen selvittäminen on tarpeen.

4. Kun inhibition astetta määritetään, on hyvä pitää mielessä, että aktiivilietteen populaatio voi muuttua, joten mikro-organismit saattavat kehittää ajan myötä toleranssin inhiboivalle kemikaalille.

5. Inhibitioasteen laskenta:

   Testi- ja kontrolliyksikön (BOD:n, DOC:n, COD:n jne.) kokonaispoistumaprosentti R_o, lasketaan seuraavasti:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   jossa:

   I = testi- tai kontrolliastian tuloveden BOD-, DOC-, COD-pitoisuus jne. (mg/l)

   E = vastaava pitoisuus poistovedessä (mg/l).

   I- ja E-arvot on korjattava siten, että testikemikaalista johtuva DOC testiyksikössä huomioidaan, sillä muuten saadaan väärä inhibitioprosentti.

▼**M4**

Testikemikaalin aiheuttaman inhibition aste lasketaan seuraavasti:

$$\text{inhibitioprosentti} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

jossa:

R_c = poistumaprosentti kontrolliastioissa

R_t = poistumaprosentti testiastioissa

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Reynolds L et al. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

2) Tämän liitteen luku C.11 Biologinen hajoaminen – aktiivilietteen soluhengityksen inhibitiotesti.

3) ISO 8192 (2007) Water quality – Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

4) ISO 15522 (1999) Water Quality – Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Lisäys 5

Heikosti veteen liukenevat testikemikaalit – haihtuvat kemikaalit

Heikosti veteen liukenevat kemikaalit

Heikosti veteen liukenevien ja liukenemattomien kemikaalien käytöstä jätevedenpuhdistusta simuloivissa testeissä on julkaistu vähän raportteja (1)(2)(3).

Ei ole yhtä testikemikaalin dispergointitapaa, joka soveltuisi kaikille liukenemattomille kemikaaleille. ISO 10634 -standardissa (4) kuvataan neljä tapaa, joista kaksi vaikuttaa soveltuvan testikemikaalien dispergointiin simulaatiotutkimusta varten: emulgointiaineiden käyttö ja/tai ultraäänienergia. Syntyvän dispersion stabiliteetti on määritettävä vähintään 24 tunnin ajalta. Sen jälkeen riittävän stabiloituneet dispersiot, joita sekoitetaan jatkuvasti säiliössä (kohta 38), annostellaan ilmastussäiliöön erillään kotitalousjätevedestä (tai synteettisestä jätevedestä).

Jos dispersiot ovat stabiileja, tutki, miten testikemikaali voidaan määrittää dispergoituneessa muodossa. DOC ei todennäköisesti sovellu tarkoitukseen, joten testikemikaalia varten on määritettävä spesifinen analyysimenetelmä, jota voidaan soveltaa poistoveteen, poistoveden kiintoainekseen ja aktiivilietteeseen. Sen jälkeen testikemikaalin kohtalo aktiivilieteprosessin simulaatiossa määritetään nestefaasissa ja kiinteässä faasissa. Näin saadaan massatase, jonka perusteella päätetään, onko testikemikaali hajonnut biologisesti. Tämä voi kuitenkin viitata vain primaariseen biohajoamiseen. Lopullinen biohajoaminen on pyrittävä osoittamaan soveltamalla nopean biologisen hajoavuuden respirometrista testiä (tämän liitteen luku C.4. C, F tai D (5)) ja käyttämällä inokulaattina lietettä, joka on altistunut testikemikaalille simulaatiotutkimuksessa.

Haihtuvat kemikaalit

Jätevedenpuhdistuksen simulaatioiden soveltaminen haihtuviin kemikaaleihin on kyseenalaista ja ongelmallista. Haihtuvien kemikaalien käytöstä simulaatiotutkimuksissa on julkaistu vain vähän raportteja, samoin kuin heikosti veteen liukenevista testikemikaaleistakin. Perinteinen täysin sekoittava laite mukautetaan tiivistämällä ilmastus- ja selkeytyssäiliöt, mittaamalla ja kontrolloimalla ilmavirtausta virtausmittareilla sekä keräämällä haihtuva orgaaninen aine kuljettamalla ulostuleva kaasu erottimien läpi. Joissakin tapauksissa käytetään tyhjiöpumppua, jolla ulostuleva kaasu ohjataan ”kylmäerottimen” läpi tai erottimeen (purge trap), jossa on Tenaxia ja silikageeliä, kaasukromatografista analyysiä varten. Erottimessa oleva testikemikaali voidaan määrittää analyyttisesti.

Testi tehdään kahdessa osassa. Ensin yksiköitä käytetään ilman lietettä, mutta niissä on synteettistä jätevettä ja testikemikaalia, jota pumpataan ilmastussäiliöön. Kaasunäytteitä kerätään tulovedestä, poistovedestä ja ulostulevasta kaasusta, ja niitä analysoidaan parin päivän ajan. Kerättyjen tietojen perusteella voidaan laskea järjestelmästä haihtuneen testikemikaalin prosenttimäärä (R_{vs}).

Sen jälkeen tehdään normaali biologinen testi (lietteen kanssa) identtisissä olosuhteissa kuin haihtuvuustutkimus (stripping). DOC- tai COD-mittaukset tehdään myös, jotta nähdään, toimivatko yksiköt tehokkaasti. Ajoittaisilla analyyseillä määritetään testikemikaali tulovedessä, poistovedessä ja ulostulevassa kaasussa testin ensimmäisessä osiossa. Adaptoitumisen jälkeen analyysejä tehdään useammin. Tasapainotilassa saaduista tiedoista voidaan jälleen laskea testikemikaalin poistumaprosentti nestefaasista kaikilla prosesseilla (R_T) (fyysiset ja biologiset) sekä järjestelmästä haihtunut osuus (R_V).

▼**M4**

Laskelma:

a) Ei-biologisessa testissä järjestelmästä haihtuneen testimateriaalin määrä prosentteina (R_{VP}) voidaan laskea seuraavasti:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

jossa

R_{VP} = testikemikaalin poistuminen haihtumalla (%)

S_{VP} = erottimeen kerätty testikemikaali ilmaistuna vastaavana pitoisuutena nestefaasissa (mg/l)

S_{IP} = testikemikaalin pitoisuus tulovedessä (mg/l).

b) Biologisessa testissä järjestelmästä haihtuneen testimateriaalin määrä prosentteina (R_V) voidaan laskea seuraavasti:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

jossa

R_V = testikemikaalin poistuminen haihtumalla biologisessa testissä (%)

S_V = erottimeen biologisessa testissä kerätty testikemikaali ilmaistuna vastaavana pitoisuutena nestemäisessä tulovirrassa (mg/l)

S_I = testikemikaalin pitoisuus tulovedessä (mg/l).

c) Biologisessa testissä kaikissa prosesseissa poistuneen testikemikaalin prosenttimäärä (R_T) saadaan seuraavasti:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

jossa

S_E = testikemikaalin pitoisuus (nestemäisessä) poistovirrassa (mg/l).

d) Niinpä biohajoamisen ja adsorption poistama prosenttiosuus (R_{BA}) voidaan laskea seuraavasti.

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Erillisillä testeillä on määritettävä, adsorboituuko testikemikaali. Jos adsorboituu, lisäkorjaus voi olla tarpeen.

e) Biologisesta (R_v) ja ei-biologisesta (R_{vp}) testijärjestelmästä haihtuneen testikemikaalin osuuden vertailu osoittaa, miten biologinen käsittely on vaikuttanut testikemikaalin päästöön ilmakehään.

Esimerkki: bentseeni

Lietteen retentioaika = 4 päivää

Synteettinen jätevesi, retentioaika = 8 h

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Niinpä

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % ja R_{BA} = 85 %.

Bentseenin ei oletettu adsorboituneen lietteeseen.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939–854.

2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

4) ISO 10634 (1995) Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

5) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys.

▼M4

Lisäys 6

Lietteen retentioajan (SRT) vaikutus kemikaalien käsiteltävyyteen

JOHDANTO

1. Päätekstissä kuvatun menetelmän tarkoitus on varmistaa, voivatko testatut kemikaalit (yleensä tunnetusti luontaisesti biohajoavia, mutta eivät helposti biohajoavia) hajota biologisesti jätevedenpuhdistamon asettamissa rajoissa. Tulokset ilmaistaan poistumaprosenttina ja biologisena hajoamisprosenttina. Aktiivilieteyksiköiden toimintaolosuhteet ja tuloveden valinta sallivat hyvin suuren vaihtelun testikemikaalin pitoisuudessa poistovedessä. Testit tehdään vain yhdellä lietteen kiintoaineksen nimellisellä pitoisuudella tai yhdellä nimellisellä lietteen retentioajalla (SRT), ja kuvatut lietteen poistumatavat voivat aiheuttaa SRT-arvon merkittävää vaihtelua testin kuluessa, sekä päivästä toiseen että päivän aikana.

2. Tässä muunnelmassa (1)(2) SRT:tä kontrolloidaan paljon tiukemmissa rajoissa jokaisen 24 tunnin jakson aikana (kuten suuressa mittakaavassakin tapahtuu), jolloin pitoisuus poistovesissä on paljon yhtenäisempi. Kotitalousjätevesi on suositeltavaa, koska sillä saadaan yhtenäisemmät ja korkeammat poistumaprosentit. Lisäksi tutkitaan useiden SRT-arvojen vaikutuksia, ja tarkemmassa tutkimuksessa voidaan määrittää eri lämpötilojen vaikutuksia pitoisuuteen poistovedessä.

3. Vielä ei ole yleistä yksimielisyyttä siitä, mitkä kineettiset mallit toimivat, kun kemikaalit hajoavat biologisesti jätevedenpuhdistuksessa vallitsevissa olosuhteissa. Kerättyihin tietoihin päätettiin soveltaa Monodin bakteerikasvun ja substraatin hyödyntämisen mallia (1)(2), sillä menetelmä oli tarkoitettu vain suurina tonnimäärinä tuotetuille kemikaaleille, jolloin pitoisuudet jätevedessä ovat yli 1 mg/l. Yksinkertaistetun mallin ja tehtyjen olettamusten luotettavuus määritettiin käyttämällä joukkoa alkoholietoksylaatteja, joiden primaarisen biohajoavuuden aste vaihteli (2)(3).

Huomautus: Tämä menetelmämuunnelma vasta suurta osaa kohdassa C.10-A kuvatun testimenetelmän tekstistä, ja tästä eteenpäin annetaan vain siitä poikkeavat tiedot.

TESTIN PERIAATE

4. Huokoisia aktiivilieteastioita, jotka on suunniteltu helpottamaan seoksen (melkein) jatkuvaa poistumaa ja jotka mahdollistavat lietteen retentioajan (SRT tai θ_s) hyvin tarkan seurannan, käytetään yhdistämättömässä tilassa useilla lietteen retentioajoilla ja valinnaisesti myös useissa lämpötiloissa. Retentioaika on yleensä 2–10 vuorokautta ja lämpötila 5–20 °C. Jätevesi, joka on mieluiten kotitalousjätevettä, ja testikemikaaliliuos annostellaan erikseen yksiköihin nopeudella, jolla saadaan tarvittava lietteen retentioaika (3–6 tuntia) ja testikemikaalin tarvittava pitoisuus tulovedessä. Kontrolliyksiköitä, joihin ei lisätä testikemikaalia, käytetään rinnakkain vertailua varten.

5. Muun tyyppisiä laitteita voidaan myös käyttää, mutta silloin on varmistettava huolellisesti, että SRT:n kontrollointi onnistuu hyvin. Jos käytetään esimerkiksi laitoksia, joissa on laskeutin, kiintoaineksen hävikki laitoksen poistoveden mukana voi olla tarpeen huomioida. Lisäksi on ryhdyttävä erityisiin varotoimiin, jotta laskeuttimessa olevan lietteen määrän vaihtelusta johtuvat virheet voidaan välttää.

▼M4

6. Yksiköitä käytetään kaikissa valituissa olosuhteissa, ja kun tasapainotila on saavutettu, testikemikaalin keskimääräiset pitoisuudet poistovesissä tasapainotilassa ja valinnaisesti DOC määritetään noin 3 viikon pituisen jakson aikana. Testikemikaalin poistumaprosentin ja valinnaisesti DOC:n arvioinnin lisäksi ilmaistaan laitoksen toimintaolosuhteiden ja poistovirran pitoisuuden välinen suhde graafisessa muodossa. Tästä voidaan laskea alustavat kineettiset vakiot ja ennustaa olosuhteet, joissa testikemikaalia voidaan käsitellä.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

7. Luvun C.10 A kohdat 12 ja 13 pätevät.

KYNNYSARVOT

8. Luvun C.10 A kohdat 14 ja 15 pätevät.

VERTAILUTESTIKEMIKAALI

9. Luvun C.10 A kohta 16 pätee.

TESTITULOSTEN TOISTETTAVUUS

10. Luvun C.10 A kohdat 17 ja 18 pätevät.

MENETELMÄN KUVAUS

Laite

11. Soveltuva laite on muunneltu huokoinen astia (lisäys 6.1). Siinä on huokoisesta polypropeenista valmistettu sisäastia (tai sisäkappale), jonka paksuus on 3,2 mm ja huokoskoko noin 90 μm ja jossa on puskuhitsausliitos. (Siksi se on tukevampi kuin tämän luvun C.10 A kohdassa 21 kuvattu yksikkö). Sisäastia asetetaan läpäisemättömään polyeteeniseen ulkoastiaan, jossa on kaksi osaa: pyöreä pohja, johon porataan reiät kahta ilmaletkua ja lietteenpoistoletkua varten, ja yläsylinteri, joka ruuvataan kiinni pohjaan ja jonka ulostulo on sijoitettu siten, että se antaa tunnetun tilavuuden (3 l) huokoiseen astiaan. Toisessa ilmaletkussa on diffuusorikivi. Toisen pää on avoin, ja se on sijoitettu kohtisuorassa astiassa olevaan kiveen. Tämä järjestelmä tuottaa tarvittavan turbulenssin, jotta astian sisältö sekoittuu täydellisesti, ja sillä saadaan liuenneen hapen pitoisuuksiksi yli 2 mg/l.

12. Soveltuva määrä yksiköitä pidetään kontrolloiduissa lämpötiloissa alueella 5–20 °C (± 1 °C) joko vesihauteessa tai huoneissa, joiden lämpötila on vakio. Tarvitaan pumput, joilla testikemikaali ja selkeytetty jätevesi voidaan annostella tarvittavalla nopeudella ilmastusastioihin (testikemikaali 0–1,0 ml/min ja jätevesi 0–25 ml/min), ja kolmas pumppu, jolla jäteliete poistetaan ilmastusastioista. Jotta jätelietteen virtausnopeus saadaan vaadittavalle hyvin alhaiselle tasolle, pumppuja käytetään suurella nopeudella ja jaksoittaisesti ajastimen avulla (esim. 10 sekuntia minuutissa ja pumpun tuotto 3 ml/min, jolloin poistumanopeudeksi saadaan 0,5 ml/min).

Suodatinlaite tai sentrifugi

13. Luvun C10 A kohta 23 pätee.

Analyysilaitteet

14. Luvun C.10 A kohta 24 pätee.

Vesi

▼M4

15. Luvun C.10 A kohdat 25 ja 26 pätevät.

Orgaaninen aine

16. Luvun C.10 A kohta 27 pätee.

Synteettinen jätevesi

17. Luvun C.10 A kohta 28 pätee.

Kotitalousjätevesi

18. Luvun C.10 A kohta 29 pätee.

Aktiiviliete

19. Luvun C10 A kohta 30 pätee.

Testikemikaalin kantaliuokset

20. Luvun C.10 A kohdat 31 ja 32 pätevät.

MENETTELY

Inokulaatin valmistus

21. Vain luvun C.10 A kohta 34 pätee – käytä aktiivilietettä (noin 2,5 g/l).

Testiyksiköiden määrä

22. Yksinkertaisessa testissä, jolla mitataan esimerkiksi poistumaprosenttia, tarvitaan vain yksi SRT, mutta 4 tai 5 STR-arvoa on tarpeen, jotta saadaan alustavien kineettisten vakioiden laskemiseen tarvittavat tiedot. Valitut arvot ovat yleensä välillä 2–10 päivää. Käytännössä on kätevää tehdä testi samanaikaisesti neljällä tai viidellä SRT:llä yhdessä lämpötilassa. Laajoissa tutkimuksissa samoja SRT-arvoja tai ehkä eri arvoja käytetään muissa lämpötiloissa (5–20 °C). Primaarisessa biohajoamisessa (pääkäyttö) tarvitaan yleensä vain yksi yksikkö yhtä olosuhdejoukkoa kohden. Lopullisessa biohajoamisessa tarvitaan kuitenkin kontrolliyksikkö jokaista olosuhdejoukkoa kohden. Kontrolliyksikköön lisätään jätevettä mutta ei testikemikaalia. Jos käytetyssä jätevedessä epäillään olevan testikemikaalia, kontrolliyksiköiden käyttö on tarpeen primaarisen biohajoamisen arvioinnissa ja laskelmiin on tehtävä tarvittavat korjaukset.

Orgaanisen aineen ja testikemikaalin annostelu

23. Luvun C.10 A kohdat 36 ja 39 pätevät, mutta huomioi, että testikemikaaliliuos annostellaan erikseen ja että käytössä on useita lietteen poistumanopeuksia. Seuraa tulo- ja poistoveden virtausnopeuksia sekä lietteen poistumaa säännöllisesti, esimerkiksi kahdesti päivässä, ja säädä ne tarvittaessa ± 10 prosentin sisään. Jos analyysimenetelmissä ilmenee ongelmia, kun käytetään kotitalousjätevettä, tee testi synteettisellä jätevedellä, mutta varmista, että eri aine antaa verrattavissa olevat kineettiset tiedot.

Aktiivilieteyksiköiden käsittely

24. Luvun C.10 A kohdat 40–43 pätevät, mutta kontrolloi SRT:tä vain lietteen ”jatkuvalla” poistumalla.

Näytteenotto ja näytteiden analyysi

25. Luvun C.10 A kohdat 44–50 pätevät, paitsi että testikemikaalin pitoisuus on määritettävä ja valinnaisesti DOC. COD:ta ei käytetä.

▼M4

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

26. Luvun C.10 A kohdat 52–54 pätevät.

Testitulosten ilmaiseminen

27. Luvun C.10 A kohdat 56–62 pätevät.

Kineettisten vakioiden laskenta

28. On realistisempaa antaa testikemikaalin keskimääräinen pitoisuus tasapainotilassa ja kuvata, miten se vaihtelee laitoksen toimintaolosuhteissa, kuin antaa primaarinen biohajoamisprosentti. Tämän voi tehdä tarkastelemalla lisäyksessä 6.2 annettua kaavaa (6), jolla saadaan K_S-, μ_m- ja θ_{SC}-arvot (kriittinen lietteen retentioaika).

(Vaihtoehtoisesti likimääräiset K_S- ja μm-arvot saadaan käyttämällä yksinkertaista tietokone-ohjelmaa, jolla kaavasta 2 (lisäys 6.2) laskettu teoreettinen kaava sovitetaan saatuihin kokeellisiin arvoihin. Vaikka mikään ratkaisu ei ole ainutlaatuinen, saadaan K_S- ja μm-arvot, jotka ovat kohtuullisen lähellä.)

Tulosten vaihtelevuus

29. On yleistä, että yksittäisille kemikaaleille saadaan erilaisia kineettisten parametrien arvoja. Arvellaan, että lietteen kasvuolosuhteilla sekä testissä vallitsevilla olosuhteilla (kuten kohdassa 5 ja muissa testeissä) on suuri vaikutus saatuihin arvoihin. Grady *et al* (4) ovat käsitelleet tätä vaihtelevuutta yhdestä näkökulmasta ja ehdottaneet, että termejä ”olemassa oleva” ja ”ominainen” pitäisi soveltaa kahteen ääriolosuhteeseen, jotka edustavat fysiologisen tilan ääripäitä, joita viljelmä voi saavuttaa kineettisen kokeen aikana. Jos tilan ei anneta muuttua testin aikana, kineettisten parametrien arvot heijastavat sen ympäristön olosuhteita, joista mikro-organismit on otettu. Näitä arvoja kutsutaan ”olemassa oleviksi”. Toisessa ääripäässä testin olosuhteet ovat sellaiset, että ne sallivat proteiinisynteesijärjestelmän täydellisen kehittymisen ja siten suurimman mahdollisen kasvunopeuden, saatuja kineettisiä parametreja kutsutaan ”ominaisiksi”, ja ne määräytyvät ainoastaan substraatin luonteen ja viljelmässä olevien bakteerien tyypin mukaan. Ohjenuorana on, että olemassa olevat arvot saadaan pitämällä substraatin pitoisuuden ja kompetenttien mikro-organismien välinen suhde (S_o/X_o) pienenä, esim. 0,025, ja ominaiset arvot saadaan, kun suhde on korkea eli vähintään 20. Kummassakin tapauksessa S_o-arvon pitää olla yhtä suuri tai suurempi kuin Ks-arvo (puolikyllästysvakio).

30. Vaihtelevuudesta ja muista biohajoavuuden kinetiikan näkökulmista keskusteltiin hiljattain pidetyssä SETAC-työpajassa (5). Raportoidut ja suunnitellut tutkimukset selventävät jätevedenpuhdistamojen kinetiikkaa, jotta olemassa olevat tiedot voidaan tulkita paremmin, ja niissä ehdotetaan paremmin soveltuvia suunnitelmia tulevia testimenetelmiä varten.

KIRJALLISUUSVIITTEET:

1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33–48.

2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340–343.

3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411–422.

▼**M4**

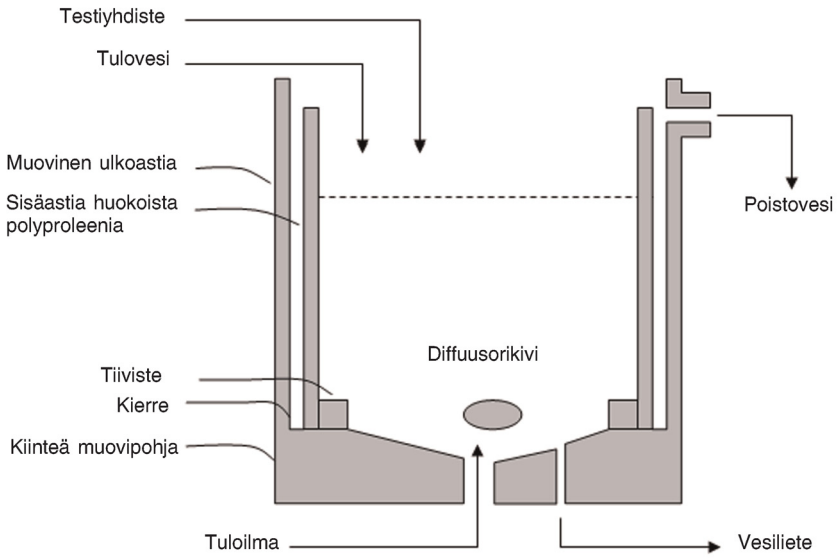
4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742–748.

5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

Lisäys 6.1

Huokoinen astia, jossa SRT-kontrolli



▼M4

Lisäys 6.2

Kineettisten vakioiden laskenta

1. Jos oletetaan, että Monodin kinetiikka pätee ja otetaan huomioon aktiivisen kiintoaineen ja substraatin massatase aktiivilietejärjestelmässä (1), saadaan seuraavat tasapainotilan lausekkeet:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

tai

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

jossa

S_1 = substraatin pitoisuus poistovedessä (mg/l)

K_S = puolikyllästysvakio; pitoisuus, jossa $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = spesifinen kasvunopeus (d^{-1})

μ_m = μ_m:n enimmäisarvo (d^{-1})

K_d = aktiivisen kiintoaineen spesifinen hajoamisnopeus (d^{-1})

θ_S = lietteen retentioajan keskiarvo, SRT (d)

Tästä yhtälöstä voi tehdä seuraavat päätelmät:

i) Pitoisuus poistovedessä ei ole riippuvainen pitoisuudesta tulovedessä (S_0). Niinpä biohajoamisprosentti vaihtelee tuloveden pitoisuuden (S_0) mukaan.

ii) Ainoa laitoksen kontrolliparametri, joka vaikuttaa S_1-arvoon, on lietteen retentioaika (θ_S).

iii) Tietylle pitoisuudelle tulovedessä (S_0) on kriittinen lietteen retentioaika:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

jossa

θ_{SC} = lietteen kriittinen retentioaika, jonka alla kompetentit mikro-organismit huuhtoutuvat laitoksesta.

iv) Koska yhtälön (2) muut parametrit liittyvät kasvukinetiikkaan, lämpötila vaikuttaa todennäköisesti poistoveden substraattitasoon ja lietteen kriittiseen ikään. Toisin sanoen tietynasteiseen käsittelyyn vaadittava lietteen retentioaika kasvaa, kun lämpötila laskee.

2. Kun otetaan huokoisten astioiden kiintoaineen massatase ja oletetaan, että kiintoaineen pitoisuus poistovedessä (X_2) on pienempi kuin ilmastusastiassa (X_1), lietteen retentioaika:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

ja

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

jossa

V = ilmastusastian tilavuus (l)

X_1 = kiintoaineen pitoisuus ilmastusastiassa (mg/l)

X_2 = kiintoaineen pitoisuus poistovedessä (mg/l)

Q_0 = tuloveden virtausnopeus (l/d)

Q_1 = jätelietteen virtausnopeus (l/d)

Niinpä lietteen retentioaikaa voidaan kontrolloida missä tahansa ennalta valitussa arvossa kontrolloimalla jätelietteen virtausnopeutta Q_1.

Päätelmät

3. Tämän testin päätarkoitus on mahdollistaa pitoisuuden arviointi poistovedessä ja siten testikemikaalin määrä vesissä, joihin päästöt kohdistuvat.

4. Kun esitetään S_1, vs. θ_S, lietteen kriittisen retentioajan θ_{SC} arviointi voi olla helppoa (esim. käyrä 3 kuvassa 1). Jos tämä ei ole mahdollista, θ_{SC} sekä likimääräiset μ_m- ja K_S-arvot voidaa laskea esittämällä S_1, vs. $S_1 \bullet \theta_S$.

Järjestämällä yhtälö (1) uudelleen saadaan

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Jos K_d on pieni, $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ ja [5]:stä tulee:

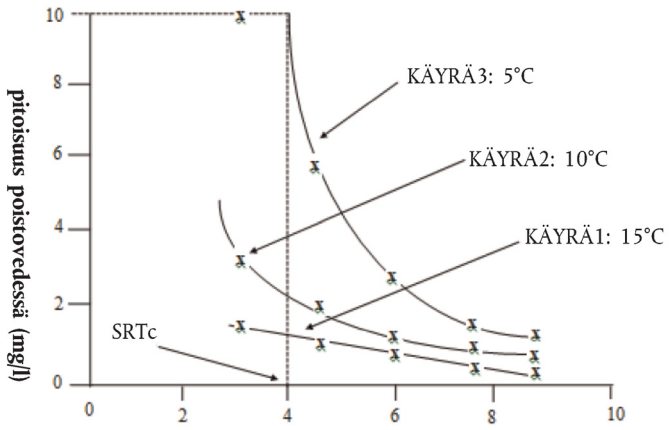
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Niinpä käyrän pitäisi olla suora viiva (katso kuva 2), jonka kaltevuus on $1/\mu_m$ ja joka leikkaa kuvaajan K_S/μ_m, myös $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

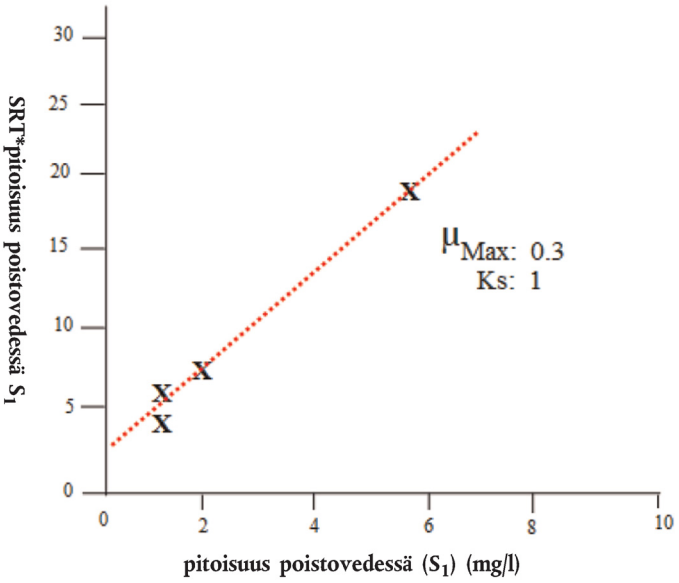
Kuva 1

Kolme lämpötilaa, viisi SRT-arvoa



Kuva 2

Regressiokuvaaja SRT S_1 vs. S_1, kun lämpötila on = 5 °C



Sanasto:

pitoisuus poistovedessä

käyrä

▼M4

Lisäys 7

TESTAUS PIENELLÄ PITOISUUSALUEELLA (µg/l)

1. Monia kemikaaleja esiintyy vesiympäristössä ja jopa jätevedessä hyvin pieninä pitoisuuksina (µg/l). Näin pieninä pitoisuuksina ne eivät todennäköisesti toimi ensisijaisina substraatteina, jotka aiheuttavat kasvua, vaan hajoavat todennäköisemmin kasvua aiheuttamattomina toissijaisina substraatteina samaan aikaan kuin joukko luonnossa esiintyviä hiilikemikaaleja. Siksi tällaisten kemikaalien hajoaminen ei sovi lisäyksessä 6 kuvattuun malliin. On olemassa monia soveltuvia malleja, ja jätevedenpuhdistamoissa vallitsevissa olosuhteissa usea malli saattaa toimia samanaikaisesti. Tämän ongelman ratkaisemiseksi tarvitaan paljon lisää tutkimusta.

2. Sillä välin voidaan noudattaa päätekstissä kuvattua menetelmää (luku C.10 A), mutta ainoastaan primaarisen biohajoamisen osalta, kun käytetään soveltuvan pieniä pitoisuuksia (< 100 µg/l) ja validoitua analyyttistä menetelmää. Biohajoamisprosentti voidaan laskea (katso testimenetelmän kohta 54), kun abioottiset prosessit (adsorptio, haihtuvuus jne.) otetaan huomioon. Esimerkkinä tästä on Nyholmin ja kumppaneiden tutkimus (1)(2), jossa käytettiin 4 tunnin jaksoa täyttö- ja poistojärjestelmässä. He ilmoittivat pseudo-ensimmäisen kertaluvun vakiot viidelle kemikaalille, joita lisättiin synteettiseen jäteveteen pitoisuudella 5–100 µg/l. (Lopulliseen biohajoamiseen voidaan käyttää ^{14}C-leimattuja testikemikaaleja. Tämän kuvaus ei kuulu tämän testimenetelmän alaan, sillä menetelmistä ei ole vielä sovittu, joskin ISO 14592 -standardissa (3) ehdotetussa menetelmässä on ohjeita ^{14}C-leimattujen kemikaalien käytöstä.

SCAS-testi

3. Myöhemmin ehdotettiin yksinkertaisempaa kaksivaiheista testiä (4)(5)(6). Puolijatkuvan aktiivilietteen (SCAS) menetelmän jälkeen SCAS-yksiköistä otetuille näytteille tehdään lyhytaikaisia kineettisiä testejä. SCAS-järjestelmää käytetään tunnetuilla lietteen poistumanopeuksilla (toisin kuin alkuperäisessä C.12-testimenetelmässä), ja siihen syötetään OECD:n synteettistä jätevettä tai kotitalousjätevettä. Synteettistä jätevettä muutettiin (koska pH-arvo muuttui ja liete selkeytyi heikosti) lisäämällä siihen fosfaattia puskurina, hiivauutetta, rauta(III)kloridia ja hivenainesuoloja, ja COD nostettiin noin arvoon 750 mg/l lisäämällä peptonin ja lihauutteen pitoisuutta. Yksiköt toimivat 24 tunnin jaksoissa: ilmastus 23 h, lietteen poistuma, selkeyttäminen, kelluvan nesteen (poistoveden) poisto ja sen jälkeen synteettisen jäteveden ja testikemikaalin lisäys, enintään 100 µg/l, (eli suunnilleen sama pitoisuus kuin lyhytaikaisessa testissä). Kerran viikossa 10 prosenttia lietteen kokonaismäärästä korvattiin tuoreella lietteellä, jotta mikrobipopulaatio pysyy tasapainossa.

4. Testikemikaalin pitoisuudet mitataan testin alussa ja ilmastuksen lopussa, ja testiä jatketaan, kunnes saavutetaan testikemikaalin vakiopoistuma. Tässä kestää yhdestä viikosta useaan kuukauteen.

Lyhytaikainen testi

5. Lyhyellä testillä (esim. 8 tuntia) määritetään testikemikaalin hajoamisen (pseudo)-ensimmäisen kertaluvun kinetiikan nopeusvakio aktiivilietteessä, jolla on tunnettu mutta eri alkuperä ja historia. Erityisesti lietenäytteitä otetaan SCAS-reaktoreista – ilmastusjakson lopussa, kun orgaanisen substraatin pitoisuus on pieni – adaptaatiokokeen (kohdat 3, 4) aikana. Lietettä voidaan ottaa vertailutarkoituksessa myös rinnakkaisesta SCAS-yksiköstä,

▼M4

jota ei altisteta testikemikaalille. Lietteen ja testikemikaalin seokset, joita lisätään vähintään kahdella pitoisuudella alueella 1–50 μg/l, ilmastetaan lisäämättä synteettistä jätevettä tai muuta orgaanista substraattia. Liuoksessa jäljellä oleva testikemikaali määritetään säännöllisin välein kemikaalin hajoavuuden mukaan, esimerkiksi kerran tunnissa, jaksona, jonka pituus ei saa olla yli 24 h. Näytteet sentrifugoidaan ennen asianmukaista analyysiä.

Laskelmat

6. SCAS-yksiköiden tietojen perusteella lasketaan testikemikaalin poistumaprosentti (kohta 54). Lisäksi voidaan laskea keskimääräinen nopeusvakio K_1 (kiintoaineiden pitoisuuden suhteen normalisoitu) seuraavasti:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

jossa

t = ilmastusaika (23 h)

C_e = pitoisuus ilmastusjakson lopussa (μg/l)

C_i = pitoisuus ilmastusjakson alussa (μg/l)

SS = aktiivilietteen kiintoaineen pitoisuus (g/l)

7. Lyhytaikaisessa testissä jäljellä oleva log%-pitoisuus esitetään käyränä suhteessa aikaan, ja käyrän ensimmäisen osan (hajoaminen 10–50 prosenttia) kulmakerroin vastaa (pseudo)-ensimmäisen kertaluvun kinetiikan vakiota K_1. Vakio normalisoidaan suhteessa lietteen kiintoaineen pitoisuuteen jakamalla kulmakertoimet kiinteiden aineiden pitoisuudella. Raportoidun tuloksen täytyy sisältää myös tiedot testikemikaalin ja kiintoaineen alkuperäisistä pitoisuuksista, lietteen retentioajasta, lietteen lisäyksestä ja lähteestä sekä mahdollisesta aiemmasta altistuksesta testikemikaalille.

Tulosten vaihtelevuus

8. Vaihtelevuudesta ja muista biohajoavuuden kinetiikan näkökulmista keskusteltiin hiljattain pidetyssä SETAC-työpajassa (7). Raportoidut ja suunnitellut tutkimukset selventävät jätevedenpuhdistamojen kinetiikkaa, jotta olemassa olevat tiedot voidaan tulkita paremmin, ja niissä ehdotetaan paremmin soveltuvia suunnitelmia tulevia testimenetelmiä varten.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339–353.

2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505–1510.

3) ISO 14592 (ISO/TC 147/ SC5/ WG4, N264) (1998). Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼M4

4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851–864.

5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711–735.

6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biokalvot

JOHDANTO

1. Simulaatiotutkimuksia tehdään tavallisesti kemikaaleille, jotka eivät ole läpäisseet biohajoavuuden seulontatestiä (tämän liitteen luvun C.4 kohta A–F (9)), mutta ovat läpäisseet luontaisen biohajoavuuden testin. Poikkeustilanteissa simulaatiotutkimuksia voidaan tehdä myös mille tahansa kemikaalille, josta tarvitaan lisää tietoa, ja etenkin suurina tonnimäärinä tuotetuille kemikaaleille. Tällöin sovelletaan tavallisesti aktiivilietetestiä (C.10 A). Joissakin tapauksissa tarvitaan kuitenkin spesifistä tietoa siitä, miten kemikaali käyttäytyy jätevedenpuhdistusmenetelmissä, joissa käytetään biokalvoja (biosuodatus eli tihkusuodatus, biorotaattorit ja leijukerros). Tätä tarkoitusta varten on kehitetty useita erilaisia laitteita.

2. Gerike *et al.* (1) käyttivät suuria, pilottimittakaavaisia biologisia suodattimia, jotka yhdistettiin toisiinsa. Nämä suodattimet veivät paljon tilaa ja vaativat suhteellisen suuria määriä jätevettä tai synteettistä jätevettä. Truesdale *et al.* (2) kuvasivat pienempiä suodattimia (halkaisija 1,8 m × 15,2 cm), joihin syötettiin luonnollista jätevettä, jossa ei ollut pinta-aktiivista ainetta, mutta tarvittavat tilavuudet olivat edelleen melko suuria. Biokalvon ”kypsymiseen” kului jopa 14 viikkoa, ja testiaineena käytetyn pinta-aktiivisen aineen ensimmäisen lisäyksen jälkeen kesti vielä 4–8 viikkoa, ennen kuin mukautuminen tapahtui.

3. Baumann *et al.* (3) kehittivät huomattavasti pienemmän suodattimen, jossa biokalvoa tukevana inerttinä aineena käytettiin ”polyesterifleeceä”, jota oli liotettu aiemmin aktiivilietteessä. Testikemikaalia käytettiin ainoana hiilen lähteenä, ja biohajoavuutta arvioitiin mittaamalla liuennut orgaaninen hiili (DOC) tulo- ja poistovedessä sekä ulostulevan kaasun CO_2-määrän perusteella.

4. Gloyna *et al.* (4) käyttivät hyvin erilaista lähestymistapaa. He keksivät pyörivän putkireaktorin. Pyörivän putken sisäpintaan kasvatettiin biokalvo tunnetulle pinta-alalle syöttämällä tulovettä putken yläpäästä, kun putki oli kallistettu pieneen vaakasuuntaiseen kulmaan. Reaktoria on käytetty pinta-aktiivisten aineiden biohajoavuuden tutkimiseen (5) sekä biokalvon optimaalisen paksuuden ja kalvon läpi tapahtuvan diffuusion tutkimiseen (6). Jälkimmäisenä mainitut tekijät jatkokehittivät reaktoria muokkaamalla sitä mm. siten, että ulostulevasta kaasusta voidaan määrittää CO_2.

5. Yhdistyneen kuningaskunnan SCA (Standing Committee of Analysts) on hyväksynyt pyörivän putkireaktorin kemikaalien biohajoavuuden (7) sekä jätevesien käsiteltävyyden ja toksisuuden (8) määrittämisen vakiomenetelmäksi. Tässä kuvatun menetelmän etuja ovat yksinkertaisuus, pieni koko, toistettavuus ja orgaanisen aineen suhteellisen pienet tilavuudet.

TESTIN PERIAATE

6. Synteettistä jätevettä tai kotitalousjätevettä sekä testikemikaalia lisätään sekoitettuna tai erikseen hitaasti pyörivän, kallistetun putken sisäpinnalle. Sisäpintaan kasvaa biosuodatusaineessa esiintyviä mikro-organismeja vastaava mikro-organismikerros. Reaktorin toimintaolosuhteet valitaan siten, että orgaanisen aineen poistuminen ja tarvittaessa ammoniumin hapettuminen on riittävää.

▼M4

7. Putken poistovesi kerätään ja laskeutetaan ja/tai suodatetaan, ennen kuin liuennut orgaaninen hiili (DOC) ja/tai testikemikaali analysoidaan spesifisellä menetelmällä. Kontrolliyksiköitä, joihin ei lisätä testikemikaalia, käytetään rinnakkain samoissa olosuhteissa vertailua varten. Poistoveden DOC-pitoisuuksien erot testi- ja kontrolliyksikössä johtuvat oletettavasti testikemikaalista ja sen orgaanisista metaboliiteista. Tätä eroa verrataan lisätyn kemikaalin pitoisuuteen (DOC:na), jotta voidaan laskea testikemikaalin poistuma.

8. Biohajoaminen voidaan tavallisesti erottaa biosorptiosta tarkastelemalla poistuma-aikakäyrää huolellisesti. Tulos voidaan yleensä vahvistaa biohajoavuuden testillä (hapenkulutus tai hiilidioksidin tuotanto), jossa käytetään sopeutunutta inokulaattia, joka on otettu testin loputtua reaktoreista, joihin testikemikaalia lisättiin.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

9. Testikemikaalin puhtauden, vesiliukoisuuden sekä haihtuvuus- ja adsorptio-ominaisuuksien on oltava tiedossa, jotta tulokset voidaan tulkita oikein.

10. Haihtuvia ja heikosti liukenevia kemikaaleja ei tavallisesti voida testata ilman erityisiä varotoimia (katso luvun C.10 A lisäys 5). Kemiallisen rakenteen tai vähintään empiirisen kaavan on oltava tiedossa, jotta voidaan laskea teoreettiset arvot ja/tai tarkistaa mitatut parametriarvot, kuten teoreettinen hapenkulutus (ThOD) ja DOC.

11. Tieto testikemikaalin toksisuudesta mikro-organismeille (katso luvun C.10 A lisäys 4) voi olla hyödyllinen soveltuvia testipitoisuuksia valittaessa ja olennainen matalien biohajoavuusarvojen oikean tulkinnan kannalta.

KYNNYSARVOT

12. Alun perin pinta-aktiivisten aineiden primaarisen biohajoamisen täytyi olla vähintään 80 prosenttia, jotta kemikaalia voitiin markkinoida. Jos 80 prosentin arvoa ei saavuteta, tätä simulaatiotutkimusta (toteamiskoetta) voidaan soveltaa ja pinta-aktiivista ainetta voidaan markkinoida vain, jos yli 90 prosenttia spesifisestä kemikaalista poistuu. Yleensä ei ole epäselvää, läpäisevätkö kemikaalit testin, ja poistumaprosenttia voidaan käyttää laskettaessa todennäköistä pitoisuutta ympäristössä, jota käytetään kemikaalin vaarallisuuden arvioinnissa. Useissa puhtaiden kemikaalien tutkimuksissa DOC:n poistumaprosentti oli yli 90 prosenttia yli kolmessa neljäsosassa tapauksista ja yli 80 prosenttia yli 90 prosentissa kemikaaleista, joissa ilmeni merkittävää biohajoavuutta.

VERTAILUKEMIKAALIT

13. Jotta voidaan varmistaa, että kokeellinen menetelmä suoritetaan oikein, on hyvä testata välillä kemikaaleja, joiden käyttäytyminen on tiedossa. Tällaisia kemikaaleja ovat esimerkiksi adipiinihappo, 2-fenyylifenoli, 1-naftoli, difeenihappo ja 1-naftoehappo.

TESTITULOSTEN TOISTETTAVUUS

14. Yhdistyneen kuningaskunnan laboratorion mukaan suhteellinen keskihajonta oli testien sisällä 3,5 prosenttia ja testien välillä 5 prosenttia (7).

▼M4

MENETELMÄN KUVAUS

Laite

Pyörivät putkireaktorit

15. Laite (lisäyksen 8 kuvat 1 ja 2) koostuu akryyliputkikehikosta. Jokaisen putken pituus on 30,5 cm ja sisähalkaisija 5 cm, ja niitä kannattavat metallitukikehikossa olevat kumireunustetut pyörät. Jokaisessa putkessa on asennusreuna, jonka syvyys on noin 0,5 cm, jotta se pysyy pyörillä. Sisäpinta on karhennettu karkealla teräsvillalla, ja yläpäässä (syöttöpäässä) on 0,5 senttiä syvä sisäreuna, joka pitää nesteen sisällä. Putket on kallistettu vaakasuuntaisesti noin yhden asteen kulmaan, jotta vaadittu kontaktiaika saavutetaan, kun testiainetta lisätään puhtaaseen putkeen. Kumipyöriä pyöritetään hitaalla, muuttuvanopeuksisella moottorilla. Putkien lämpötilaa kontrolloidaan asentamalla ne lämpötilasäädettyyn huoneeseen.

16. Kun jokainen putkireaktori suljetaan hieman suurempaan suljettuun putkeen ja varmistetaan, että liitokset ovat kaasutiiviitä, ulostuleva CO_2-kaasu voidaan kerätä emäksiseen liuokseen myöhempää mittausta varten (6).

17. Jokaisesta putkesta kerätään 24 tunnin tuotos orgaanista ainetta ja mahdollisesti lisättyä testikemikaalia 20 l:n säilytysastiaan (A) (katso kuva 2). Testikemikaaliliuos voidaan tarvittaessa annostella erikseen. Lähellä jokaisen säilytysastian pohjaa on ulostulo, joka on yhdistetty soveltuvalla letkulla (esim. silikonikumisella) peristalttisen pumpun (B) kautta lasiseen tai akryyliseen syöttöputkeen, joka tulee 2–4 cm kallistetun putken (C) ylemmän pään (syöttöpään) sisään. Poistoveden annetaan tippua kallistetun putken alapäästä, josta se kerätään toiseen säilytysastiaan (D). Poistovesi selkeytetään tai suodatetaan ennen analyysiä.

Suodatinlaite-sentrifugi

18. Näytteiden suodattamiseen käytettävä kalvosuodatin, jonka huokoskoko on sopiva (aukon nimellishalkaisija 0,45 μm) ja joka adsorboi orgaanisia kemikaaleja tai vapauttaa mahdollisimman vähän orgaanista hiiltä. Jos käytettävät suodattimet vapauttavat orgaanista hiiltä, poista orgaaninen hiili pesemällä suodattimet huolellisesti kuumalla vedellä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää sentrifugia, jolla voidaan saavuttaa 40 000 m/s^2:n kiihtyvyys.

19. Analyysilaitteet seuraavia määrityksiä varten:

— DOC / orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) tai kemiallinen hapenkulutus (COD)

— spesifinen kemikaali (HPLC, GC jne.) tarvittaessa

— pH, lämpötila, happamuus ja emäksisyys

— ammonium, nitriitti ja nitraatti, jos testit tehdään nitrifioivissa olosuhteissa.

Vesi

20. Vesijohtovesi, jossa DOC:tä on alle 3 mg/l.

21. Tislattu tai deionisoitu vesi, jossa DOC:tä on alle 2 mg/l.

▼M4

Orgaaninen aine

22. Orgaanisena aineena voidaan käyttää synteettistä jätevettä, kotitalousjätevettä tai näiden yhdistelmää. On osoitettu, että pelkän kotitalousjäteveden käyttö nostaa usein DOC:n poistumaprosenttia (aktiivilieteyksiköissä) ja sallii jopa sellaisten kemikaalien biologisen hajoamisen, jotka eivät hajoa biologisesti käytettäessä OECD:n synteettistä jätevettä. Niinpä kotitalousjäteveden käyttö on suositeltavaa. Mittaa jokaisen uuden orgaanisen aine-erän DOC-pitoisuus (tai COD-pitoisuus). Orgaanisen aineen happamuuden tai emäksisyyden täytyy olla tiedossa. Orgaaniseen aineeseen voi olla tarpeen lisätä soveltuvaa puskuria (natriumvetykarbonaattia tai kaliumvetyfosfaattia), jos happamuus tai emäksisyys on matala, jotta pH on 7,5 ± 0,5 reaktorissa testin aikana. Lisättävän puskurin määrä ja lisäämisen ajankohta on päätettävä tapauskohtaisesti.

Synteettinen jätevesi

23. Liuota yhteen litraan vesijohtovettä: 160 mg peptonia, 110 mg lihauutetta, 30 mg ureaa, 28 mg vedetöntä dikaliumvetyfosfaattia (K_2HPO_4), 7 mg natriumkloridia (NaCl), 4 mg kalsiumkloridihydraattia ($CaCl_2.2H_2O$), 2 mg magnesiumsulfaattiheptahydraattia ($MgSO_4.7H_2O$). Tämä OECD:n synteettinen jätevesi on esimerkki, ja siinä tulovirtauksen DOC-pitoisuuden keskiarvo on noin 100 mg/l. Vaihtoehtoisesti voi käyttää muita koostumuksia, joiden DOC-pitoisuus on suunnilleen sama ja jotka ovat lähempänä oikeaa jätevettä. Tätä synteettistä jätevettä voidaan valmistaa tislattuun veteen väkevöidyssä muodossa. Se säilyy viikon noin 1 °C:n lämpötilassa. Laimenna tarvittaessa vesijohtovedellä. (Tämä aine ei ole tyydyttävä, sillä esimerkiksi typpipitoisuus on hyvin korkea ja hiilipitoisuus suhteellisen matala, mutta parempia ehdotuksia ei ole tehty, lukuun ottamatta fosfaatin lisäämistä puskurina ja peptonin lisäämistä).

Kotitalousjätevesi

24. Käytä tuoretta selkeytettyä jätevettä, jota kerätään päivittäin puhdistamosta, johon tulee pääasiassa kotitalousjätevettä. Jätevesi kerätään primaarisen sedimentaatioaltaan ylivuotokanavasta tai aktiivilietelaitoksen syötöstä, eikä siinä saa juurikaan olla karkeita hiukkasia. Jätevettä voidaan käyttää, kun sitä on säilytetty usea päivä noin 4 °C:n lämpötilassa, jos voidaan todistaa, että DOC (tai COD) ei ole laskenut merkittävästi (alle 20 %) säilytyksen aikana. Jotta järjestelmän häiriöt voidaan välttää, jokaisen uuden erän DOC (tai COD) on säädettävä soveltuvaan vakioarvoon esimerkiksi vesijohtovedellä laimentamalla.

Voiteluaine

25. Peristalttisen pumpun rullat voidaan voidella glyserolilla tai oliiviöljyllä. Kumpikin aine sopii silikonikumisiin letkuihin.

Testikemikaalin kantaliuokset

26. Jos kemikaalin liukoisuus on riittävä, valmista kantaliuokset, joiden pitoisuus on soveltuva (esim. 1–5 g/l), deionisoituun veteen tai synteettisen jäteveden mineraaleihin. Tietoa liukenemattomista kemikaaleista on luvun C.10-A lisäyksessä 5. Tämä menetelmä soveltuu haihtuville kemikaaleille ilman, että putkireaktoreihin tarvitsee tehdä muutoksia (kohta 16). Määritä kantaliuoksen DOC ja TOC ja toista mittaukset jokaiselle uudelle erälle. Jos DOC- ja TOC-arvon välinen ero on yli 20 prosenttia, tarkista testikemikaalin vesiliukoisuus. Varmista, että saanto on riittävän hyvä (tavallisesti > 90 prosenttia on odotettavissa), vertaamalla nimellisarvoon DOC-arvoa tai

▼M4

testikemikaalin pitoisuutta, joka on mitattu kantaliuoksen ominaisanalyysilla. Varmista etenkin dispersioiden osalta, voidaanko DOC-arvoa käyttää analyyttisenä parametrina vai voidaanko käyttää ainoastaan testikemikaalikohtaista analyysimenetelmää. Näytteet on sentrifugoitava, jos kyseessä on dispersio. Mittaa jokaisen uuden erän DOC, COD tai testikemikaali ominaisanalyysilla.

27. Määritä kantaliuoksen pH. Äärimmäiset arvot viittaavat siihen, että kemikaalin lisääminen saattaa vaikuttaa testijärjestelmän aktiivilietteen pH-arvoon. Jos näin käy, neutraloi kantaliuos pienillä määrillä epäorgaanista happoa tai emästä, kunnes pH on 7 ± 0,5, mutta vältä testikemikaalin saostumista.

MENETTELY

Orgaanisen aineen valmistelu annostusta varten

28. Varmista, ettei tulo- ja poistoveden säiliössä tai tuloveden säiliöistä tulevissa ja poistoveden säiliöön johtavissa putkissa ole mikrobikasvustoja puhdistamalla ne huolellisesti ennen testiä ja testin aikana.

29. Valmista tuoretta synteettistä jätevettä (kohta 23) päivittäin joko kiintoaineesta tai väkevöidystä kantaliuoksesta laimentamalla sitä sopivassa suhteessa vesijohtovedellä. Mittaa tarvittava määrä sylinteriin ja lisää se puhtaaseen tuloveden säiliöön. Jos tarpeen, lisää synteettiseen jäteveteen tarvittava määrä testikemikaalin tai vertailukemikaalin kantaliuosta ennen laimentamista. Jos testikemikaalin häviötä on käytännöllistä tai tarpeellista välttää, valmista erillinen laimennettu testikemikaaliliuos erillisessä säiliössä ja syötä se kallistettuihin putkiin erillisellä annostelupumpulla.

30. Vaihtoehtoisesti (ja mieluiten) voidaan käyttää selkeytettyä kotitalousjätevettä (kohta 24), joka kerätään päivittäin tuoreena, jos mahdollista.

Pyörivien putkireaktoreiden toiminta

31. Yhden testikemikaalin arviointiin tarvitaan kaksi identtistä putkireaktoria, ja ne kootaan huoneessa, jonka lämpötilaa säädellään (tavallisesti 22 ± 2 °C).

32. Säädä peristalttinen pumppu pumppaamaan orgaanista ainetta (ilman testikemikaalia) nopeudella 250 ± 25 ml/h kallistettuihin putkiin, joita pyöritetään nopeudella 18 ± 2 rpm. Voitele pumpun putket aluksi voiteluaineella (kohta 25) ja toista voitelu säännöllisesti, jotta putket toimivat asianmukaisesti ja kestävät pitkään.

33. Säädä putkien kallistuskulma vaakasuuntaisesti siten, että puhtaaseen putkeen syötetyn liuoksen viipymäaika on 125 ± 12,5 sekuntia. Arvioi retentioaika lisäämällä syötettävään liuokseen ei-biologista merkkiainetta (esim. NaCl, inertti väriaine): huippupitoisuuden saavuttamiseen poistovedessä kuluvaa aikaa pidetään keskimääräisenä retentioaikana (kun kalvo on suurimmillaan, retentioaika voi nousta noin 30 minuuttiin).

34. Näiden nopeuksien ja aikojen on todettu tuottavan riittävät (> 80 %) DOC- (tai COD-) poistumat ja tuottavan nitrifioitua poistovettä. Virtausnopeutta on muutettava, jos poistuma ei ole riittävää tai jos on tarkoitus simuloida tietyn puhdistuslaitoksen toimintaa. Säädä jälkimmäisessä tapauksessa orgaanisen aineen annostelunopeutta, kunnes reaktorin toiminta vastaa puhdistuslaitoksen toimintaa.

▼M4

Ymppäys

35. Ilmalevinteinen ymppäys voi riittää käynnistämään mikro-organismien kasvun, kun käytetään synteettistä jätevettä. Muussa tapauksessa lisää 1 ml/l selkeytettyä jätevettä syötteeseen 3 päivän ajan.

Mittaukset

36. Tarkista säännöllisesti, että annosnopeudet ja pyörimisnopeudet ovat vaadituissa rajoissa. Mittaa myös poistoveden pH varsinkin, jos nitrifikaatio on odotettavissa.

Näytteenotto ja näytteiden analyysi

37. Näytteenoton menetelmä, malli ja tiheys valitaan testin tarkoituksen mukaisesti. Tulo- ja poistovedestä voi ottaa hetkellisiä näytteitä tai kerätä näytteitä pitemmällä aikavälillä (esim. 3–6 h). Ota ensimmäisellä jaksolla (ilman testikemikaalia) näytteitä kahdesti viikossa. Suodata näytteet kalvojen läpi tai sentrifugoi kiihtyvyydellä 40 000 m/s^2 noin 15 minuutin ajan (kohta 18). Näytteet voi olla tarpeen selkeyttää ja/tai karkeasuodattaa ennen kalvosuodatusta. Määritä DOC (tai COD) ainakin kahdesti ja tarvittaessa BOD, ammonium ja nitriitti/nitraatti.

38. Kaikki analyysit on tehtävä mahdollisimman pian näytteiden keräämisen ja valmistelun jälkeen. Jos analysointia on lykättävä, säilytä näytteitä täysissä ja tiiviisti suljetuissa pulloissa pimeässä tilassa, jonka lämpötila on noin 4 °C. Jos näytteitä on säilytettävä yli 48 tuntia, säilö ne pakastamalla, hapottamalla tai lisäämällä soveltuvaa myrkyllistä kemikaalia (esim. 20 ml/l elohopea(II)kloridiliuosta, jonka pitoisuus on 10 g/l). Varmista, ettei säilömistapa vaikuta analyysin tuloksiin.

Esivaihe

39. Tässä vaiheessa pintabiokalvo kasvaa optimaaliseen paksuuteen. Siinä kestää yleensä noin 2 viikkoa, mutta ei kuitenkaan yli 6 viikkoa. DOC-poistuma (tai COD-poistuma) (kohta 44) kasvaa ja saavuttaa tasannearvon. Kun kummassakin putkessa saavutetaan vastaavat tasannearvot, toinen putki valitaan kontrolliputkeksi testin loppuvaiheen ajaksi. Putkien toiminnan on pysyttävä yhdenmukaisena tämän ajan.

Testikemikaalin lisääminen

40. Lisää tässä vaiheessa testikemikaali toiseen reaktoriin vaaditussa pitoisuudessa, yleensä 10–20 mg C/l. Kontrolliin tulee edelleenkin pelkkää orgaanista ainetta.

Akklimatisaatiojakso

41. Jatka DOC:n (tai COD:n) analysointia kahdesti viikossa, ja jos halutaan arvioida primaarista biohajoamista, mittaa myös testikemikaalin pitoisuus ominaisanalyysillä. Odota testikemikaalin ensimmäisen lisäyksen jälkeen 1–6 viikkoa (tai kauemmin erityisolosuhteissa), jotta akklimatisaatio tapahtuu. Kun poistumaprosentti (kohdat 43–45) saavuttaa enimmäisarvon, määritä 12–15 luotettavaa arvoa tasannevaiheessa noin 3 viikon aikana keskimääräisen poistumaprosentin arviointia varten. Testi on valmis, jos saavutetaan riittävän korkea poistumisaste. Yleensä testin ei ole tarkoitus kestää yli 12 viikkoa testikemikaalin ensimmäisen lisäämisen jälkeen.

▼M4

Kalvon irtoaminen liuskoina

42. Ylimääräistä kalvoa irtoaa säännöllisin väliajoin liuskoina putkista. Varmista tulosten vertailukelpoisuuden säilyminen antamalla testin kattaa vähintään kaksi täyttä kasvu- ja irtoamisjaksoa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

43. Laske testikemikaalin DOC-poistumaprosentti (tai COD-poistumaprosentti) jokaisen ajoitetun arvioinnin osalta käyttämällä kaavaa:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

jossa

D_t = DOC-poistumaprosentti (tai COD-poistumaprosentti) aikana t

Cs = testikemikaalin aiheuttama tuloveden DOC-pitoisuus (tai COD-pitoisuus), mieluiten arvioituna kantaliuoksen pitoisuuden ja lisätyn tilavuuden perusteella (mg/l)

E = testipoistovirrasta mitattu DOC-arvo (tai COD-arvo) aikana t (mg/l)

Eo = kontrollipoistovirrasta mitattu DOC-arvo (tai COD-arvo) aikana t (mg/l)

Tee samat laskelmat vertailukemikaalille, jos sellaista testataan.

Kontrollireaktorin toiminta

44. Orgaanisen aineen DOC-poistumisaste (tai COD-poistumisaste) (D_B) kontrollireaktoreissa antaa hyödyllistä tietoa, kun biokalvon biohajoamistoimintaa arvioidaan testin aikana. Laske poistumaprosentti seuraavan kaavan avulla:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

jossa

Cm = DOC (tai COD) kontrollitulovirran orgaanisessa aineessa (mg/l).

45. Laske testikemikaalin poistuma (D_{ST}), jos se on mitattu, ominaisanalyysillä jokaisella arviointikerralla seuraavalla kaavalla:

$$DST = 100\ (1 - S_e/S_i)\ \%$$

jossa

Si = testikemikaalin mitattu tai mieluiten arvioitu pitoisuus testitulovirrassa (mg/l)

Se = testikemikaalin mitattu pitoisuus testipoistovirrassa aikana t (mg/l)

▼M4

Jos analyysimenetelmällä saadaan jätevedessä positiivinen arvo, joka vastaa arvoa S_c mg/l laske poistumaprosentti (D_{SC}) seuraavalla kaavalla:

$$DSC = 100\ (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c)\ \%$$

Testitulosten ilmaiseminen

46. Esitä poistumaprosentti D_t ja D_{ST} (tai D_{SC}), jos käytettävissä, graafisesti ajan funktiona (katso lisäys 2, luku C.10-A). Tasannevaiheessa otettujen 12–15 D_T-arvon (ja D_{ST}-arvon, jos käytettävissä) kokonaisluvuksi pyöristetty keskiarvo ja keskihajonta ovat testikemikaalin poistumaprosentti. Poistumakäyrän muodosta voidaan tehdä joitakin päätelmiä poistumisprosessista.

Adsorptio

47. Jos testikemikaalin DOC-poistuma on korkea testin alussa, testikemikaali poistuu todennäköisesti adsorboitumalla biokalvoon. Tämän todistaminen voi olla mahdollista määrittämällä kalvosta liuskoina irronneeseen kiintoaineeseen adsorboitunut testikemikaali. Adsorboituvien kemikaalien DOC-poistuma ei tavallisesti pysy korkeana koko testin ajan. Tavallisesti poistumisaste on korkea aluksi ja laskee sitten hiljalleen tasapainoarvoon. Jos adsorboitunut testikemikaali aiheutti kuitenkin mikrobipopulaation adaptoitumista, testikemikaalin DOC-poistuma nousee myöhemmin ja saavuttaa korkean tasannearvon.

Lag-vaihe

48. Samoin kuin staattisissa seulontatesteissä, monet testikemikaalit vaativat lag-vaiheet, ennen kuin biologinen hajoaminen on täydellistä. Lag-vaiheen aikana kompetentit bakteerit adaptoituvat eikä testikemikaalia poistu juuri lainkaan. Sen jälkeen alkaa näiden bakteerien alkukasvu. Tämä vaihe loppuu ja hajoamisvaiheen katsotaan alkavan suunnilleen silloin, kun noin 10 prosenttia testikemikaalin alkuperäisestä määrästä on poistunut (adsorptio huomioiden, jos sitä tapahtuu). Lag-vaihe on usein erittäin vaihteleva, ja sen toistettavuus on huono.

Tasannevaihe

49. Jatkuvassa testissä poistumakäyrän tasannevaihe on vaihe, jossa hajoaminen on maksimaalista. Tasannevaiheen on kestettävä vähintään 3 viikkoa, ja sen aikana on mitattava noin 12–15 kelvollista arvoa.

Testikemikaalin keskimääräinen poistumisaste

50. Laske testikemikaalin tasannevaiheen poistumisarvojen D_t (ja D_{st}, jos käytettävissä) keskiarvo. Kun se pyöristetään lähimpään kokonaislukuun (1 %), saadaan testikemikaalin poistumisaste. On myös suositeltavaa laskea keskiarvon 95 prosentin luottamusväli. Laske samoin kontrolliastiassa olevan orgaanisen aineen keskimääräinen poistumisaste (D_B).

▼M4

Viite biologisesta hajoamisesta

51. Jos testikemikaali ei adsorboidu merkittävästi biokalvoon ja poistumakäyrän muoto vastaa tyypillistä biologisen hajoamisen käyrää, jossa näkyvät lag-, hajoamis- ja tasannevaihe (kohdat 48 ja 49), mitattua poistumaa voidaan pitää biologisesta hajoamisesta johtuvana. Jos poistuminen on aluksi runsasta, simulaatiotutkimuksella ei voida erottaa biologisia ja abioottisia eliminaatioprosesseja. Jos näin käy tai jos biologisesta hajoamisesta on muuten epävarmuutta (esim. haihtumista tapahtuu), analysoi adsorboituneet testikemikaalit kalvonäytteissä tai testaa biologista hajoavuutta tekemällä lisää tilastollisia (seulonta)testejä niiden parametrien perusteella, jotka viittaavat selvästi biologisiin prosesseihin. Tällaisia testejä ovat hapenkulutuksen menetelmät (tämän liitteen luku C.4, D, E ja F) (9) tai testi, joka mittaa CO_2-tuotantoa (tämän liitteen luku C.4-C tai kohta Headspace-menetelmä) (10). Käytä inokulaattina ennalta altistettua biokalvoa asianmukaisesta reaktorista.

52. Jos sekä DOC-poistuma että spesifisen kemikaalin poistuma on mitattu, poistumaprosenttien merkittävät erot (ensimmäinen on matalampi kuin jälkimmäinen) viittaavat siihen, että poistovesissä on orgaanisia välituotteita, jotka saattavat hajota heikosti. Niitä on tutkittava.

Testitulosten luotettavuus

53. Testi on luotettava, jos DOC-poistumisaste (tai COD-poistumisaste) (D_B) kontrolliyksiköissä on > 80 prosenttia kahden viikon kuluttua eikä epätavallisia havaintoja ole tehty.

54. Jos helposti biohajoavaa (vertailu)kemikaalia on testattu, biohajoamisen asteen pitäisi olla > 90 prosenttia, eikä kahden rinnakkaistuloksen ero saa olla yli 5 prosenttia. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, tarkista kokeelliset menetelmät ja/tai hanki kotitalousjätevettä toisesta lähteestä.

55. Samoin kahden testikemikaalia käsittelevän rinnakkaisyksikön (jos käytössä) biohajoamisarvojen ero ei saa olla yli 5 prosenttia. Jos tämä kriteeri ei täyty, mutta poistumisasteet ovat korkeita, jatka analyysiä vielä kolme viikkoa. Jos poistumisaste on matala, tutki testikemikaalin inhibitiovaikutuksia, jos ne eivät ole tiedossa, ja toista testi käyttämällä testikemikaalin alempaa pitoisuutta, jos se on mahdollista.

Testiraportti

56. Testiraportissa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— tunnistetiedot

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä.

Testiolosuhteet:

— mahdolliset testijärjestelmän muutokset varsinkin, jos testataan liukenemattomia tai haihtuvia aineita

— orgaanisen aineen tyyppi

— teollisuusjäteveden osuus jätevedestä ja sen ominaisuudet, jos käytössä ja tiedossa

— inokulaatiomenetelmä

▼M4

— testikemikaalin kantaliuos – DOC (liuennut orgaaninen hiili) ja TOC (orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus), valmistustapa, onko suspensio, käytetty testipitoisuus tai -pitoisuudet, syyt jos DOC ei ole alueella 10–20 mg/l, lisäystapa, ensimmäisen lisäyksen päivämäärä, mahdolliset pitoisuuden muutokset

— hydraulisen retentioajan keskiarvo (ilman kasvua), putken pyörimisnopeus, keskimääräinen kallistuskulma, jos mahdollista

— tiedot liuskoina irtoamisesta, aika ja voimakkuus

— testilämpötila ja -alue

— käytetyt analyyttiset tekniikat.

Testitulokset:

— kaikki mitatut tiedot, DOC, COD, ominaisanalyysit, pH, lämpötila, N-kemikaalit, mikäli aiheellista

— kaikki lasketut D_t- (tai D_{tc}-), D_B- ja D_S-arvot taulukoituina sekä poistumakäyrät

— lag- ja tasannevaiheiden tiedot, testin kesto, testikemikaalin tai vertailukemikaalin (jos testattu) ja kontrolliyksikön orgaanisen aineen poistumisaste sekä tilastotiedot ja lausumat biologisesta hajoavuudesta ja testin luotettavuudesta

— tulosten pohdinta.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753–758.

2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441–444.

3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355–1357.

5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92–94.

6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865–881.

7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

9) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys, A–F.

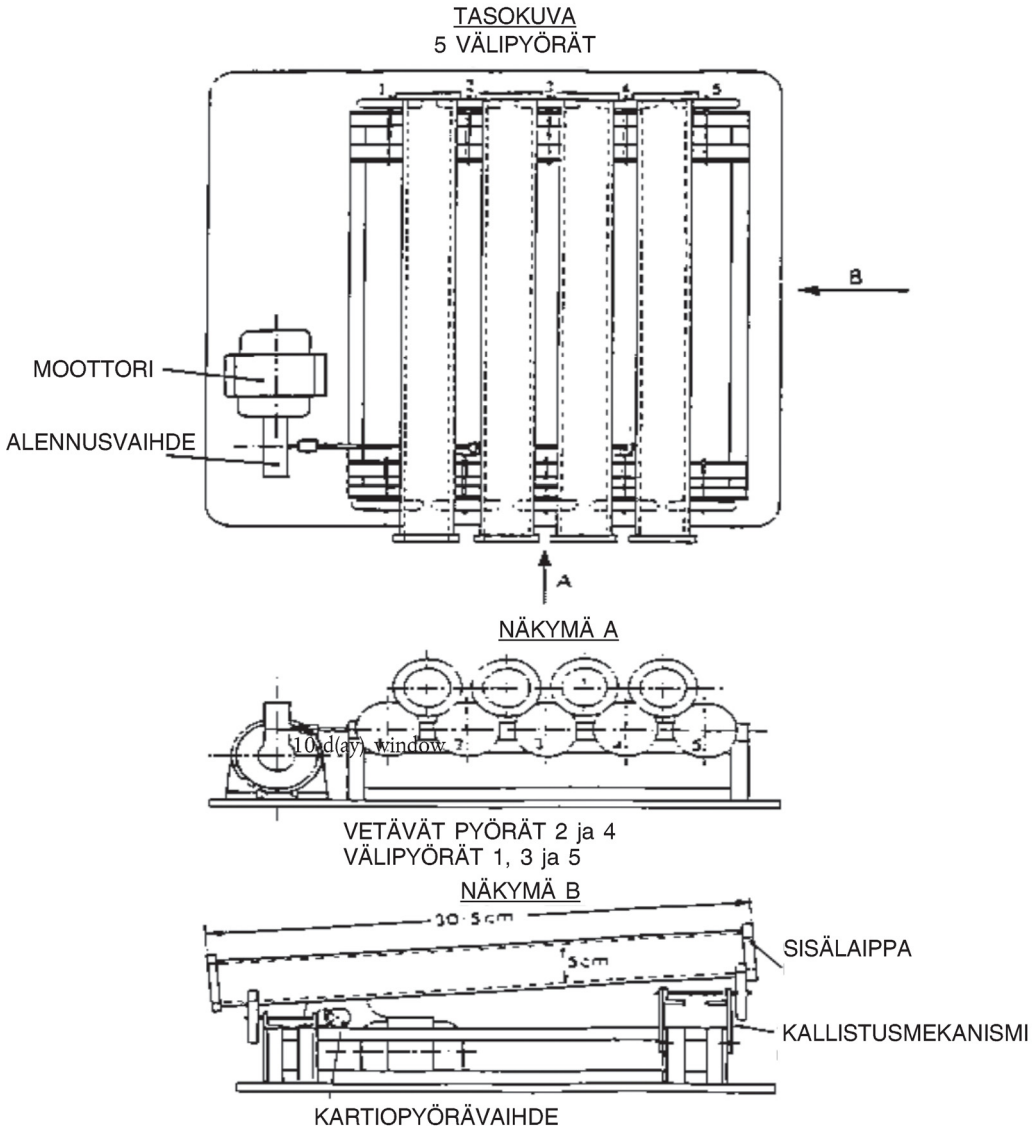
10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

Lisäys 8

Kuva 1

Pyörivät putket



Sanasto:

tasokuva

näkymä A/B

vetävät pyörät

välipyörät

moottori

alennusvaihde

sisälaippa

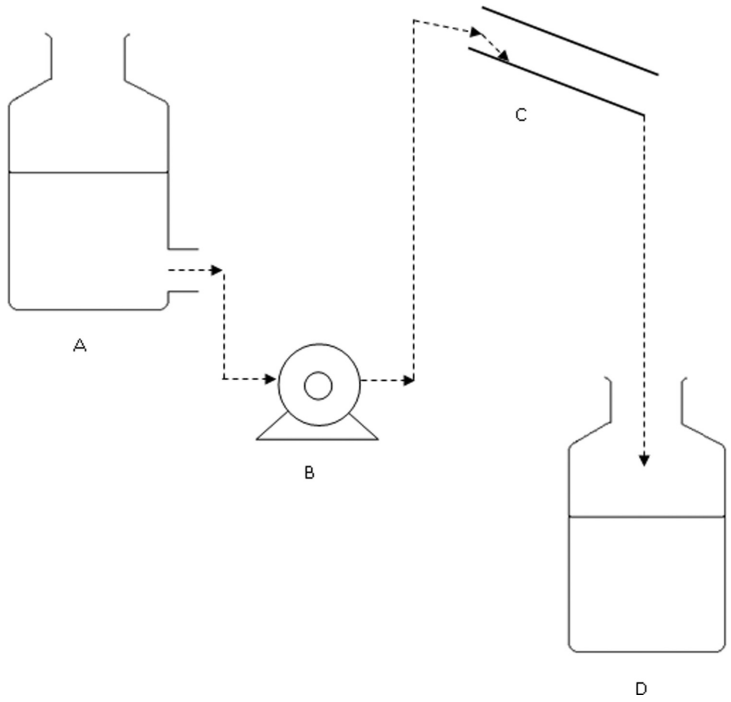
kallistusmekanismi

kartiopyörävaihde

▼**M4**

Kuva 2

Virtauskaavio



A: syöttöallas

B: peristalttinen pumppu

C: pyörivä putki

D: poistoveden keräysastia

MÄÄRITELMÄT:

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Kemikaalit: UNCED-sopimuksissa ja niihin liittyvissä asiakirjoissa termiä ”kemikaali” käytetään laajassa merkityksessä, joka kattaa kaikki aineet, tuotteet, seokset, valmisteet yms., joita olemassa olevissa järjestelmissä voidaan käyttää.

▼B

C.11. **BIOLOGINEN HAJOAMINEN**

AKTIIVILIETTEEN SOLUHENGITYKSEN INHIBITIOTESTI

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Tässä kuvatun menetelmän avulla arvioidaan testattavan aineen vaikutus mikro-organismeihin määrittämällä soluhengitysaste tietyissä olosuhteissa, joissa testattavaa ainetta on läsnä eri suuruisina pitoisuuksina.

Tällä seulontamenetelmällä voidaan nopeasti määrittää aineet, jotka saattavat vaikuttaa haitallisesti aerobisiin mikrobikasvustoihin sekä määrittää testattavien aineiden biologisiin hajoamiskokeisiin sopivat pitoisuudet, joilla ei ole inhibitiovaikutusta.

Ennen varsinaista koetta voidaan tehdä raja-annostesti. Sen avulla määritetään varsinaisessa kokeessa käytettävien pitoisuuksien rajat.

Tutkimussuunnitelma sisältää kaksi kontrollia, joissa ei käytetä tutkittavaa ainetta, toinen koesarjan alussa ja toinen koesarjan lopussa. Jokainen aktiiviliete-erä tulee lisäksi tarkistaa vertailuaineen avulla.

Tämä menetelmä soveltuu parhaiten sellaisten aineiden tutkimiseen, jotka vesiliukoisuutensa ja alhaisen haihtuvuutensa ansiosta todennäköisesti jäävät veteen.

Rajoitetusti väliaineisiin liukenevien aineiden EC_{50}-määritys saattaa olla vaikeaa.

Hapenkulutukseen perustuvat tulokset saattavat olla harhaanjohtavia, mikäli testattavalla aineella on taipumusta osallistua hapettavaan fosforylaatioon.

Seuraavat tiedot helpottavat testin suorittamista:

— vesiliukoisuus,

— höyrynpaine,

— rakennekaava,

— aineen puhtaus.

Suositus:

Aktiiviliete saattaa sisältää patogeenejä ja sitä on sen vuoksi käsiteltävä varoen.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Soluhengitysasteella tarkoitetaan aerobisessa lietteessä olevien jäteveden mikro-organismien hapenkulutusta, joka yleensä ilmoitetaan muodossa mg O_2/mg lietettä tunnissa.

▼B

Kun lasketaan testattavan aineen tietyn pitoisuuden inhibitiovaikutus, soluhengitysaste ilmoitetaan prosentteina kahden kontrollin soluhengitysasteen keskiarvosta:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{ procentuell hämming}$$

jossa:

R_s = testatun aineen hapenkulutusaste koepitoisuuden,

Rc_1 = hapenkulutusaste, kontrolli 1,

Rc_2 = hapenkulutusaste, kontrolli 2.

Tässä menetelmässä EC_{50}:llä tarkoitetaan testattavan aineen pitoisuutta, jota käytettäessä hengitysaste on 50 % kokeessa käytetyn kontrollin soluhengitysasteesta.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineena suositellaan käytettäväksi 3,5-dikloorifenolia, joka on tunnettu hengitysinhibiittori. Jokaisen aktiiviliete-erän EC_{50} testataan tällä aineella, jotta voidaan varmistua siitä, että lietteen herkkyys ei ole epänormaali.

1.4 TESTIN PERIAATE

Standardiannoksella synteettistä jätevesiravinnetta ravitun aktiivilietteen soluhengitysaste mitataan 30 minuutin ja/tai kolmen tunnin kontaktiajan kuluttua. Saman aktiivilietteen soluhengitysaste mitataan samoissa koeolosuhteissa, kun siihen on lisätty erisuuruisia pitoisuuksia testattavaa ainetta. Testattavan aineen tietyn pitoisuuden inhiboiva vaikutus ilmaistaan prosentteina kahden kontrollin soluhengitysasteen keskiarvosta. EC_{50}-arvo lasketaan eri pitoisuuksilla tehdyistä määrityksistä.

1.5 LAATUVAATIMUKSET

Testitulokset ovat hyväksyttäviä, jos

— kahden kontrollin hengitysasteissa on korkeintaan 15 %:n ero,

— 3,5-dikloorifenolin EC_{50}-arvo (30 minuuttia ja/tai 3 tuntia) on välillä 5–30 mg/l.

1.6 TESTIN KUVAUS

1.6.1 *Reagenssit*

1.6.1.1 Testattavasta aineesta tehdyt liuokset

Tutkimuksen alkaessa testattavasta aineesta tehdään tuore liuos käyttämällä varastoliuosta. Varastohuoksen soveltuva pitoisuus on 0,5 g/l, kun testi suoritetaan alla selostettua menettelytapaa noudattaen.

▼B

1.6.1.2 Kontrolliaineliuos

3,5-dikloorifenoliliuos voidaan valmistaa esimerkiksi seuraavasti: liuotetaan 0,5 g 3,5-dikloorifenolia 10 ml:aan 1 M NaOH:a, laimennetaan noin 30 ml:aan tislatulla vedellä, liuokseen sekoitetaan 0,5 M H_2SO_4:a kunnes saostuminen alkaa — tähän tarvitaan noin 8 ml 0,5 M H_2SO_4:ää — ja lopuksi seoksesta tehdään litra liuosta lisäämällä tislattua vettä. Liuoksen pH on tällöin 7–8.

1.6.1.3 Synteettinen jätevesi

Synteettinen jätevesiravinneliuos valmistetaan liuottamalla seuraavat ainemäärät litraan vettä:

— 16 g peptonia,

— 11 g lihauutetta,

— 3 g ureaa,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$,

— 2,8 g K_2HPO_4.

Huomautus 1: Tämä synteettinen jätevesi on 100-kertainen tiiviste OECD:n teknisessä raportissa ”Proposed method for the determination of the biodegrability of surfactants used in synthetic detergents” (June 11, 1976) esitetystä jätevedestä, paitsi että se sisältää myös dikaliumvetyfosfaattia.

Huomautus 2: Ellei ravintoainetta käytetä välittömästi valmistuksen jälkeen, sitä säilytetään pimeässä 0–4 °C:n lämpötilassa enintään viikon ajan. Aineen koostumus ei saa muuttua säilytyksen aikana. Ravintoaine voidaan myös steriloida ennen säilytystä tai peptoni ja lihauute voidaan lisätä vasta juuri ennen testin suorittamista. Ennen käyttöä liuos sekoitetaan huolellisesti ja sen pH säädetään.

1.6.2 *Laitteet*

Mittauslaite: Mittauslaitetta ei ole tarkoin määrätty. Nesteen yläpuolella ei saisi kuitenkaan olla tilaa ja elektrodin olisi sovittava tiukasti mittapullon kaulaan.

Testiin tarvitaan tavanomaisia laboratoriovälineitä ja erityisesti jäljempänä lueteltuja laitteita:

— mittauslaite,

— ilmastuslaite,

— pH-elektrodi |a mittauslaite,

— O_2-elektrodi.

1.6.3 *Inokulaatin valmistus*

Testissä käytetään mikrobi-inokulaattia, joka on tehty pääasiassa kotitalousjätevesiä puhdistavan laitoksen aktiivilietteestä.

Suuret hiukkaset poistetaan antamalla laboratorioon tuodun lietteen selkeytyä jonkin aikaa, esim. 15 minuuttia, jonka jälkeen hienojakoisempi pintakerros otetaan talteen. Toinen tapa on sekoittaa lietettä sekoittimella muutaman sekunnin ajan.

▼B

Jos lietteessä arvellaan olevan inhiboivaa ainetta, liete pestään vesijohtovedellä tai isotonisella liuoksella. Sentrifugoinnin jälkeen kelluva neste poistetaan (tämä menettely toistetaan kolme kertaa).

Pieni määrä lietettä kuivataan ja punnitaan. Tämän perusteella voidaan laskea, paljonko märkää lietettä on sekoitettava veteen, jotta saadaan aktiivilieteliuos, jonka kiinteiden aineiden osuus on 2–4 g/l. Tämä taso edellyttää 0,8–1,6 gramman pitoisuutta litrassa testiliuosta, kun käytetään jäljempänä suositeltua menettelytapaa.

Ellei lietettä voida käyttää hankintapäivänä, lisätään edellä selostetulla tavalla valmistettuun aktiivilietteeseen 50 ml synteettistä jätevettä litraa kohden. Seosta ilmastetaan 20 ± 2 °C:n lämpötilassa yön yli ja pidetään ilmastettuna, kunnes se käytetään seuraavana päivänä. Ennen käyttöä pH määritetään ja pH-arvoksi säädetään 6–8. Kiinteiden aineiden osuus liuoksessa määritetään edellisessä kappaleessa selostetulla tavalla.

Jos samaa liete-erää käytetään useana peräkkäisenä päivänä (enintään neljänä päivänä), lietteeseen lisätään jokaisen käyttöpäivän iltana synteettistä jätevettä 50 ml litraa kohden.

1.6.4 *Testin suorittaminen*

Kesto/kontaktiaika:	30 minuuttia ja/tai kolme tuntia, jonka kuluessa tapahtuu ilmastus
Vesi:	juomavettä (tarpeen vaatiessa kloori poistettu)
Ilmansaanti:	puhdasta, öljytöntä ilmaa. Ilman virtaus 0,5–1 l/minuutti
Määrityslaite:	tasapohjainen pullo, esim. BOD-pullo
Happimittari:	piirturilla varustettu happielektrodi
Ravinneliuos:	synteettinen jätevesi (ks. edellä)
Testattava aine:	testissä käytetään testin alkaessa valmistettua tuoretta liuosta
Vertailuaine:	esim. 3,5-dikloorifenoli (vähintään kolme pitoisuutta)
Kontrollit:	inokuloitu näyte ilman testattavaa ainetta
Lämpötila:	20 ± 2 °C.

Jäljempänä esitettyä menettelytapaa voidaan noudattaa sekä testattavan aineen että vertailuaineen osalta kolmen tunnin kontaktiajan testissä.

Testiin tarvitaan useita astioita (esim. yhden litran dekantterilaseja).

Testissä on käytettävä vähintään viittä pitoisuutta, joiden vakioero on enintään 3,2.

Kokeen alkaessa eli ajassa ”0” tehdään 300 ml liuosta liuottamalla 16 ml synteettistä jätevettä veteen. Tähän lisätään 200 ml mikrobiinokulaattia ja näin saatu seos (500 ml) kaadetaan ensimmäiseen astiaan (ensimmäinen kontrolli C_1).

▼B

Koeastioita ilmastetaan jatkuvasti, jotta liuennut O_2 ei pääse laskemaan alle 2,5 mg/l, ja jotta juuri ennen soluhengityksen mittaamista O_2-pitoisuus olisi noin 6,5 mg/l.

Ajassa ”15 minuuttia” (15 minuuttia on valinnainen, mutta käyttökelpoinen aika) edelläoleva toistetaan, paitsi että 100 ml testattavan aineen varastoliuosta lisätään 16 ml:aan synteettistä jätevettä. Sen jälkeen lisätään vettä, jotta saadaan 300 ml liuosta ja mikrobi-inokulaatti, jolloin määräksi tulee 500 ml. Seos kaadetaan astiaan numero kaksi ja ilmastetaan kuten edellä. Tämä toistetaan 15 minuutin välein muuttaen testattavan aineen varastohuoksen määrää siten, että saadaan sarja astioita, joissa on testattavaa ainetta eri suuruisina pitoisuuksina. Lopuksi valmistetaan toinen kontrolli (C_2).

Kolmen tunnin kuluttua kirjataan pH; ensimmäisestä astiasta otettu hyvin sekoitettu näyte kaadetaan määrityslaitteeseen ja soluhengitysaste mitataan enintään 10 minuutin ajalta.

Sama toimenpide suoritetaan kunkin astian osalta 15 minuutin välein siten, että jokaisen astian kontaktiaika on kolme tuntia.

Jokainen mikrobi-inokulaattierä testataan vertailuaineella samalla tavoin.

Kun määritykset suoritetaan 30 minuutin kontaktiajan jälkeen, menettelytapaa täytyy muuttaa (esim. yksi happimittari ei riitä).

Jos kemiallisen hapenkulutuksen mittaus on tarpeen, valmistetaan koeastioita, jotka sisältävät testattavaa ainetta, synteettistä jätevesiravinnetta ja vettä, mutta ei aktiivilietettä. Hapenkulutus määritetään ja kirjataan 30 minuutin ja/tai kolmen tunnin (kontaktiaika) ilmastuksen jälkeen.

2. **TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI**

Soluhengitysaste lasketaan piirturilta väliltä 6,5 mg O_2/l–2,5 mg O_2/l tai 10 minuutin ajalta soluhengitysasteen ollessa alhainen. Hengitysaste on määritettävä hengityskäyrän lineaarisesta kohdasta.

Elleivät kahden kontrollin soluhengitysasteet ole 15 %:n sisällä toisistaan tai vertailuaineen EC_{50} (30 minuuttia ja/tai kolme tuntia) ole hyväksyttävä (5–30 mg/l käytettäessä 3,5-dikloorifenolia), testiä ei voida hyväksyä ja se on uusittava.

Prosentuaalinen inhibitio määritetään kunkin pitoisuuden osalta (ks. 1.2). Se esitetään pitoisuutta kohden log-normaali- (tai log-todennäköisyys-) paperilla ja johdetaan EC_{50}-arvo.

EC_{50}-arvojen 95 %:n luotettavuusrajat lasketaan standardimenetelmiä käyttäen.

▼B

3. RAPORTOINTI

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— testattava aine: kemiallinen rakenne,

— testausmenetelmä: aktiivilietteen hankintapaikka, pitoisuus ja mahdollinen esikäsittely,

— koeolosuhteet:

  — seoksen pH ennen soluhengityksen määrittämistä,

  — koelämpötila,

  — kokeen kesto,

  — vertailuaine ja siitä määritetty EC_{50},

  — abioottinen hapen yhteytys (mikäli esiintyy),

— tulokset:

  — kaikki määritystulokset,

  — inhibitiokäyrä ja EC_{50}-arvon laskutapa,

  — EC_{50} mikäli mahdollista 95 %:n varmuusrajoin, EC_{20} ja EC_{80},

  — kaikki tarkkailutulokset ja tämän testausmenetelmän muutokset, joilla saattaa olla vaikutusta tuloksiin.

3.2 TULOSTEN TULKINTA

EC_{50}-arvoa on pidettävä ainoastaan viitteenä testattavan aineen mahdollisista myrkyllisistä vaikutuksista, jotka kohdistuvat jäteveden puhdistukseen aktiivilietemenetelmällä tai jäteveden mikro-organismeihin, koska ympäristössä syntyviä monimutkaisia keskinäisiä vaikutuksia ei pystytä tarkoin simuloimaan laboratoriokokeissa. Ammoniakin hapettumista inhiboivien testattavien aineiden inhibitiokäyrät saattavat lisäksi olla epätyypillisiä. Niitä on tulkittava varovaisuutta noudattaen.

4. LÄHDELUETTELO

1) Kansainvälinen standardi ISO 8192-1986.

2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, s. 165.

3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, s. 245.

4) ETAD, (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method* No 103, selostettu myöskin seuraavissa:

5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, s. 80.

6) Schefer, W., *Textdveredlung* 6, 1977, s. 247.

7) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209,* Decision of the Council C(84) 30 final.

▼B

C.12. **BIOLOGINEN HAJOAMINEN**

MODIFIOITU SCAS-TESTI

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Menetelmän tarkoituksena on arvioida vesiliukoisten, haihtumattomien orgaanisten aineiden mahdollinen lopullinen biologinen hajoaminen, kun ne altistetaan pitkäksi ajaksi mikro-organismien suurille pitoisuuksille. Mikro-organismien elinkykyä pidetään edellä tämän ajan kuluessa lisäämällä selkeytettyä jätevesiravinnetta päivittäin. (Viikonloppuina tarvittava jätevesi voidaan varastoida 4 ºC:ssa. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää OECD:n toteamiskokeen synteettistä jätevettä.)

Liuokseen suspensoituneisiin kiinteisiin aineosiin voi tapahtua fysikaalis-kemiallista adsorptiota ja tämä on otettava huomioon tuloksia tulkittaessa (ks. 3.2).

Nestefaasin pitkän pidätysajan (36 tuntia) ja ravinteiden ajoittaisen lisäämisen vuoksi koe ei simuloi jätevesipuhdistamossa vallitsevia olosuhteita. Testattavilla aineilla saadut tulokset viittaavat siihen, että biologinen hajoamispotentiaali on testissä suuri.

Tämä testi antaa erittäin sopivat puitteet testattavan yhdisteen hajottamiseen sopivien mikro-organismien valinnalle ja/tai adaptaatiolle. (Menetelmällä voidaan myös tuottaa adaptoituja inokulaatteja muita kokeita varten.)

Tässä menetelmässä liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuuden määritystä käytetään testattavien aineiden lopullisen biologisen hajoamisen arviointiperusteena. Liuenneen hiilen määrittäminen happamaksi tekemisen ja huuhtelun jälkeen on suositeltavampaa kuin sen määrittäminen $C_{kokonais}$ -$C_{epaorgaaninen}$ erona.

Samanaikaisesti käytetyllä ominaisanalyysimenetelmällä voidaan määrittää aineen biologinen primaarihajoaminen (alkuperäisen kemiallisen rakenteen häviäminen).

Tällä menetelmällä voidaan tutkia vain sellaisia orgaanisia aineita, jotka testissä käytetyn pitoisuuden osalta täyttävät seuraavat edellytykset:

— ovat vesiliukoisia (vähintään 20 mg liuennutta orgaanista hiiltä/l),

— joiden höyrynpaine on mitätön,

— eivät estä bakteeritoimimaa,

— eivät merkitsevästi absorboidu käytetyssä testissä,

— eivät poistu testiliuoksesta vaahtoamisen vuoksi.

Testattavan aineen sisältämä orgaaninen hiili on määritettävä.

▼B

Tiedot testattavan materiaalin pääaineosien suhteellisista osuuksista auttavat tulosten tulkinnassa, varsinkin jos tulokset ovat alhaisia tai marginaalisia.

Tiedot aineen myrkyllisistä vaikutuksista mikro-organismeihin ovat avuksi alhaisten tulosten tulkinnassa ja oikeiden pitoisuuksien valinnassa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

C_T = testattavan yhdisteen pitoisuus joko selkeytetyssä jätevedessä olevana tai siihen lisättynä orgaanisena hiilenä ilmastusjakson alkaessa (mg/l),

C_1 = testissä käytetyn liuoksen kelluvaan nesteeseen liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus ilmastusjakson lopussa (mg/l),

C_c = kontrolliliuoksen kelluvaan nesteeseen liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus ilmastusjakson lopussa (mg/l),

Tässä menetelmässä biologinen hajoaminen ilmenee orgaanisen hiilen katoamisena. Biologinen hajoaminen voidaan ilmaista seuraavasti:

1. Prosentuaalinen poistuma D_{da} päivittäin lisätyn aineen määrästä:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \tilde{n} 100 \qquad (1)$$

jossa

D_{da} = hajoaminen/päivittäinen lisäys.

2. Prosentuaalinen poistuma D_{ssd} aineen määrästä päivän alkaessa:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

jossa

D_{ssd} = hajoaminen/aine päivän alkaessa;

indeksit i ja (i + 1) viittaavat määrityspäivään.

Yhtälöä 2 (a) suositellaan käytettäväksi, mikäli poistoveteen liuennut orgaaninen hiili vaihtelee päivästä toiseen, kun taas yhtälö 2 (b) sopii käytettäväksi määrän pysyessä suhteellisen vakiona päivästä päivään.

▼B

1.3 VERTAILUAINEET

Tutkittaessa uutta ainetta vertailuaineista saattaa joissakin tapauksissa olla apua, mutta mitään tiettyä vertailuainetta ei kuitenkaan suositella.

Joidenkin yhdisteiden rengasreaktioiden tulokset esitetään lisäyksessä 1, jotta menetelmä voidaan kalibroida aika ajoin ja suorittaa tulosten vertailua jotakin toista menetelmää käytettäessä.

1.4 TESTIN PERIAATE

Jätevesipuhdistamosta peräisin olevaa aktiivilietettä pannaan puolijatkuvaan aktiivilieteyksikköön (semi-continuous activated sludge unit, SCAS). Testattava yhdiste selkeytetään, lisätään selkeytettyä kotitalousjätevettä ja seosta ilmastetaan 23 tuntia. Tämän jälkeen ilmastus lopetetaan, lietteen annetaan selkeytyä ja kelluva neste poistetaan.

Ilmastuskammioon jäävään lietteeseen sekoitetaan uusi määräannos testattavaa yhdistettä ja jätevettä ja sykli toistetaan.

Biologinen hajoaminen määritetään mittaamalla kelluvasta nesteestä liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus. Saatua arvoa verrataan kontrolliin, johon on lisätty ainoastaan selkeytettyä jätevettä.

Ominaisanalyyttisellä menetelmällä voidaan määrittää biologisesta hajoamisesta johtuvat muutokset alkuperäismolekyylin pitoisuudessa (biologinen primaarihajoaminen).

1.5 LAATUVAATIMUKSET

Tämän liuenneen orgaanisen hiilen poistumiseen perustuvan menetelmän toistettavuutta ei vielä ole vahvistettu. (Biologisen primaarihajoamisen osalta saadaan hyvin tarkkoja tietoja aineista, joiden hajoavuus on hyvä.)

Menetelmän herkkyys riippuu suuresti nollakokeen vaihteluista ja jonkin verran myös liuenneen orgaanisen hiilen määrityksen tarkkuudesta sekä nesteessä olevan testattavan yhdisteen määrästä kunkin syklin alussa.

1.6 TESTIN KUVAUS

1.6.1 *Testin valmistelu*

Testiä varten varataan puhtaita ilmastusyksiköitä tai vaihtoehtoisesti alkuperäinen 1,5 litran SCAS-testiyksikkö ja ilmaputki kutakin testattavaa ainetta ja kontrollia varten (kuva 1). Koeyksikköihin pumpataan vanusuodattimella puhdistettua paineilmaa, jossa ei ole orgaanista hiiltä, ja joka on esikyllästetty vedellä haihtumisesta johtuvan hävikin vähentämiseksi.

Pääasiassa kotitalousjätevettä käsittelevästä puhdistamosta otetaan nestenäyte, jossa on 1–4 g kiinteitä aineita litraa kohden. Tätä nestettä tarvitaan kutakin ilmastusyksikköä kohden noin 150 ml.

▼B

Testattavasta aineesta tehdään varastoliuokset tislattuun veteen. Tarvittava pitoisuus on yleensä 400 mg/l orgaanista hiiltä, joka antaa testattavan yhdisteen pitoisuudeksi 20 mg/l hiiltä kunkin ilmastussyklin alkaessa, ellei biologista hajoamista tapahdu.

Suurempia pitoisuuksia voidaan käyttää, jos mikro-organismeihin kohdistuvat myrkkyvaikutukset eivät ole esteenä sille.

Varastoliuosten orgaanisen hiilen pitoisuus määritetään.

1.6.2 *Koeolosuhteet*

Testi on suoritettava 20–25 °C:n lämpötilassa.

Testissä käytetään korkeita aerobisia mikro-organismipitoisuuksia (1–4 g/l suspendoituja kiinteitä aineita) ja tehokas retentioaika on 36 tuntia. Jätevesiravinteessa oleva hiilipitoinen aines hapettuu suuresti yleensä kahdeksan tunnin kuluessa ilmastussyklin alkamisesta. Sen jälkeen lietteessä tapahtuu endogeenista uloshengitystä ilmastuksen loppuajan, ja tämän ajan kuluessa testattava yhdiste on ainoa substraatti, ellei tämäkin metaboloidu helposti. Nämä ominaisuudet yhdessä päivittäisen uudelleenymppäyksen kanssa, kun kotitalousjätevettä käytetään ravinteena, antavat hyvät mukautumis- ja biologiset hajoamisedellytykset.

1.6.3 *Testin suorittaminen*

Pääasiassa kotitalousjätevettä käsittelevästä aktiivilietelaitoksesta, tai laboratorioyksiköstä, hankittu nesteseos pidetään aerobisena laboratoriokäyttöön asti. Kuhunkin ilmastus- ja kontrolliyksikköön pannaan 150 ml nesteseosta (alkuperäistä SCAS-yksikköä käytettäessä käytetään kymmenkertaista määrää) ja ilmastus aloitetaan. Ilmastus lopetetaan 23 tunnin kuluttua ja lietteen annetaan selkeytyä 45 minuuttia. Kunkin astian hana avataan vuorollaan ja 100 ml erä kelluvaa nestettä poistetaan. Juuri ennen käyttöä hankittua selkeytettyä kotitalousjätevettä lisätään 100 ml kuhunkin ilmastusyksikköön jäävään lietteeseen ja ilmastus aloitetaan uudelleen. Tässä vaiheessa ei lisätä testattavaa ainetta ja yksikköihin lisätään ainoastaan kotitalousjätevettä päivittäin, kunnes selkeytyksen jälkeinen kelluva neste on kirkasta. Tähän kuluu yleensä korkeintaan kaksi viikkoa, jolloin kelluvaan nesteeseen liuenneen orgaanisen hiilen määrä jokaisen ilmastussyklin lopussa lähestyy vakio arvoa.

Tämän ajan lopussa yksiköissä olevat lietteet sekoitetaan keskenään ja 50 ml näin yhdistettyä lietettä lisätään kuhunkin yksikköön.

Kontrolliyksikköihin lisätään 95 ml selkeytettyä jätevettä ja 5 ml vettä ja testiyksikköihin 95 ml selkeytettyä jätevettä ja 5 ml testattavan yhdisteen varastoliuosta (400 mg/l). Ilmastus aloitetaan jälleen ja sitä jatketaan 23 tuntia. Sen jälkeen lietteen annetaan selkeytyä 45 minuuttia, kelluva neste poistetaan ja siitä analysoidaan liuennut orgaaninen hiilipitoisuus.

Edellä esitetyt täyttö- ja poistotoimenpiteet suoritetaan testin aikana päivittäin.

▼B

Ennen selkeytystä voi olla tarpeen puhdistaa yksikön seinämät, jotta nestepinnan yläpuolelle ei pääse kertymään kiinteitä aineita. Kutakin yksikköä varten on varattava oma kaavin tai harja, jotta yksikköjen välillä ei pääse tapahtumaan kontaminaatiota.

Kelluvissa nesteissä oleva liuennut orgaaninen hiili tulee mieluimmin määrittää päivittäin, mutta harvemminkin tapahtuvat määritykset ovat hyväksyttäviä. Ennen analyysiä nesteet suodatetaan pestyillä 0,45 μm kalvosuodattimilla tai sentrifugoidaan. Kalvosuodattimet ovat sopivia, jos ne eivät vapauta hiiltä eivätkä absorboi ainetta suodatusvaiheessa. Aineen lämpötila sentrifugissa ei saa ylittää 40 ºC:+ta.

Testin kestoaikaa ei ole määrätty testattaessa yhdisteitä, jotka hajoavat heikosti tai ei lainkaan, mutta kokemus on osoittanut, että ajan tulisi yleensä olla vähintään 12 viikkoa ja korkeintaan 26 viikkoa.

2. TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

Koe- ja kontrolliyksikköjen kelluviin nesteisiin liuenneen orgaanisen hiilen arvot esitetään käyränä suhteessa aikaan.

Kun biologinen hajoaminen saavutetaan, testissä saavutettu taso lähenee kontrollien tasoa. Kun ero on pysyvä kolmessa peräkkäisessä määrityksessä, määrityksiä tehdään vielä tietojen tilastollisen käsittelyn edellyttämä määrä ja testattavan yhdisteen biologinen hajoamisprosentti lasketaan (D_{j_a} tai D_{ssd}, ks. 1.2).

3. RAPORTOINTI

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— kaikki jätevettä ja käytettyä koeyksikköä koskevat tiedot ja testattavalla aineella ja mahdollisella vertailuaineella saadut tulokset sekä nollakokeen tulokset,

— lämpötila,

— poistumakäyrä ja selostus, laskutapa (ks. 1.2),

— aktiivilietteen ja jäteveden hankintapaikka ja -aika, adaptaatiotiedot, pitoisuus jne.,

— testausmenetelmään tehtyjen muutosten tieteelliset perustelut,

— allekirjoitus ja päiväys.

▼B

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Koska testattava aine ei ole tällä menetelmällä biologisesti helposti hajoavaa, pelkästään biologisesta hajoamisesta johtuva liuennut orgaaninen hiili poistuu yleensä vähitellen päivien tai viikkojen kuluessa, paitsi milloin mukautuminen tapahtuu äkillisesti, mikä näkyy äkillisenä poistumana muutamien viikkojen kuluttua.

Fysikaalis-kemiallisella adsorptiolla voi joskus olla huomattava vaikutus. Tähän viittaa lisätyn liuenneen orgaanisen hiilen täydellinen tai osittainen poistuma kokeen alussa. Sen jälkeinen kehitys riippuu adsorption asteesta sekä poistettuun poistovirtaan suspendoituneiden kiinteiden aineiden pitoisuudesta. Kontrollin ja kokeen kelluviin nesteisiin liuenneen orgaanisen hiilipitoisuuden ero kasvaa tavallisesti asteittain kokeen alun alhaisesta arvosta ja tämä ero pysyy sitten saavuttamallaan uudella tasolla testin loppuajan, ellei adaptaatiota tapahdu.

Lisätutkimuksia tarvitaan, mikäli biologinen hajoaminen (tai osittainen biologinen hajoaminen) ja adsorptio halutaan erottaa toisistaan. Tämä voidaan tehdä usealla tavalla, mutta luotettavin tapa on käyttää kelluvaa nestettä tai lietettä inokulaattina perussarjan testissä (mieluimmin respirometritestissä).

Testattavia aineita, joiden liuenneen orgaanisen hiilen täydellinen tai osittainen poistuma ilman adsorptiota on tässä testissä korkea, voidaan pitää biologisesti hajoavina. Osittainen poistuma ilman adsorptiota osoittaa, että kemikaali hajoaa biologisesti ainakin jossakin määrin.

Alhainen tai nollapoistuma saattaa johtua testattavan aineen mikroorganismeihin kohdistuvasta inhibitiovaikutuksesta, joka voi myös ilmetä lietteen liukenemisena ja häviämisenä, jolloin kelluva neste on sameaa. Koe on uusittava testattavan aineen alhaisemmalla pitoisuudella.

Suurempi herkkyys saadaan käyttämällä ominaisanalyysiä tai ^{14}C:llä merkittyä testattavaa ainetta. Mikäli testattava yhdiste on merkitty ^{14}C:llä, $^{14}CO_2$:n toteaminen osoittaa, että biologista hajoamista on tapahtunut.

Kun tulokset ilmoitetaan myös primaarihajoamisena, alkuperäisen testattavan aineen reagoimattomuuteen johtanut kemiallinen rakennemuutos tulisi mahdollisuuksien mukaan selvittää.

Analyysimenetelmän kelpoisuus samoin kuin nollakokeen elatusaineesta saatu vaste on ilmoitettava.

4. **LÄHDELUETTELO**

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A,* Decision of the Council C(81)30 final.

▼B

Lisäys 1

SCAS-testi: esimerkki tuloksista

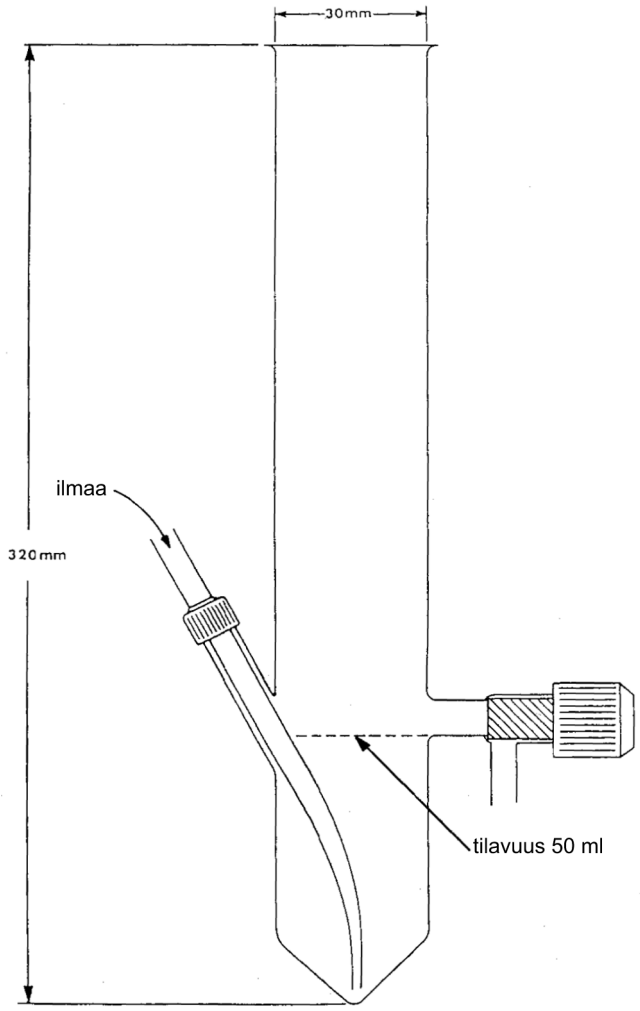
Aine	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/1)	Biologinen hajoamisprosentti, D_{da},	Kokeen kesto (päiviä)
4-asetyyliaminobentseemsulfonaatt]	17,2	2,0	85	40
Tetrapropyleembentseenisulfonaatti	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenoli	16,9	0,8	95,3	40
Dietyleeniglykoli	16,5	0,2	98,8	40
Aniliini	16,9	1,7	95,9	40
Syklopentaanitetrakarboksylaatti	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Lisäys 2

Esimerkki koelaitteesta

Figure 1



▼B

C.13. **BIOKERTYVYYS: TESTI KALOILLA LÄPIVIRTAUSOLOSUHTEISSA**

1. **MENETELMÄ**

Tämä biokertyvyysmenetelmä on toisinto OECD:n testausohjeesta N:o 305 (1996).

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä karakterisoidaan kemiallisten aineiden biokertymispotentiaalia kaloihin läpivir-tausolosuhteissa. Vaikka läpivirtausolosuhteissa suoritettu testaus on paras, puolistaattiset olosuhteet ovat hyväksyttäviä, jos validiteetti on varmistettu.

Menetelmässä annetaan riittävän tarkat ohjeet testin suorittamiseksi samalla kun on mahdollista mukauttaa koejärjestelyä laboratorioiden erityisolosuhteisiin ja testattavien aineiden erilaisiin ominaisuuksiin. Luotettavimmin voidaan testata stabiileja orgaanisia aineita, joiden log P_{ow}-arvot ovat 1,5–6,0 (1), mutta myös erityisen lipofiilisiä aineita ($logP_{ow}$ > 6,0). Alustava arvio tällaisten erityisen lipofiilisten aineiden biokertyvyystekijälle (bioconcentration factor, BCF), josta käytetään joskus merkintää K_B, on todennäköisesti korkeampi kuin laboratoriokokeista saatava biokertyvyystekijä tasapainotilassa (BCF_{SS}). Orgaanisille aineille, joiden log P_{ow}-arvot saattavat olla jopa 9,0, voidaan saada biokertyvyystekijän alustavia arvioita Binteinin et al (2) yhtälön avulla. Biokertyvyyspotentiaalia luonnehtivia muuttujia ovat mm. kertymävakio (k_1), poistumavakio (k_2) ja BCF_{SS}.

Radioaktiivisilla isotoopeilla leimatut aineet saattavat helpottaa vesi- ja kalanäytteiden analysointia, ja niitä voi käyttää sen arvioimiseksi, onko hajoamistuotteet tunnistettava ja kvantifioitava. Jos mitataan radioaktiivisten jäämien kokonaismäärä (esim. polttamalla tai kudosta liuottamalla), BCF perustuu perusyhdisteeseen, mahdollisesti jäljellä oleviin aineenvaihduntatuotteisiin sekä assimiloituneeseen hiileen. Radioaktiivisten jäämien kokonaismäärään perustuva BCF ei siis ole välttämättä suoraan verrattavissa BCF:ään, joka on johdettu pelkästään perusyhdisteen spesifisestä kemiallisesta analyysistä.

Jos käytetään radioaktiivisia leimoja, voidaan tehdä puhdistustoimenpiteitä perusyhdisteeseen perustuvan BCF:n määrittämiseksi, ja tärkeimmät aineenvaihduntatuotteet voidaan karakterisoida, jos se katsotaan tarpeelliseksi. On myös mahdollista yhdistää kalan aineenvaihduntatutkimus ja biokertyvyystutkimus, jossa kudoksissa esiintyvät jäämät analysoidaan ja tunnistetaan.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Biokertyvyys (biokonsentraatio) on organismissa tai sen pinnalla (sen tietyssä kudoksessa) olevan testattavan aineen pitoisuuden lisääntyminen verrattuna testattavan aineen pitoisuuteen väliaineessa.

Biokertyvyystekijä (bioconcentration factor BCF tai K_B) minä tahansa tämän kertyvyystestin kertymä-vaiheen ajankohtana on testattavan aineen pitoisuus kalassa (kalan pinnalla) tai tietyssä kalan kudoksessa [C_f, ug/g (ppm)] jaettuna kyseisen aineen pitoisuudella väliaineessa [C_w, µg/ml (ppm)].

▼B

Biokertyvyystekijä tasapainotilassa (steady state) (BCF_{SS} tai K_B) ei muutu merkittävästi pitkän ajanjakson aikana, kun testattavan aineen pitoisuus väliaineessa on vakio tänä aikana.

Tasapainotila saavutetaan kalassa esiintyvän testattavan aineen määrää (C_t) ajan funktiona esittävässä käyrässä silloin, kun käyrä on aika-akselin suuntainen, kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä C_t-määritystä ovat samat ± 20 prosenttia eikä näiden kolmen näytteenottoajanjakson välillä ole merkittäviä eroja. Yhdistettyjä näytteitä määritettäessä vaaditaan vähintään neljä peräkkäistä määritystä. Kun testataan aineita, joiden kertyminen kudoksiin tapahtuu hitaasti, välit voivat olla pikemminkin seitsemän vuorokautta.

Biokertyvyystekijöitä, jotka lasketaan suoraan kineettisistä nopeusvakioista (k_1/k_2) sanotaan kineettisiksi kertyvyystekijöiksi BCF_k.

Oktanoli-vesi-jakautumiskerroin (PJ on kemiallisen aineen n-oktanoliliukoisuuden ja vesiliukoisuuden suhde tasapainotilassa (menetelmä A.8), josta käytetään myös merkintää K_{ow}. P_{ow}:n logaritmia käytetään merkitsemään kemiallisen aineen biokertyvyyttä vesieliöissä.

Altistumis- eli kertymisvaibe on aika, jona kalat altistetaan testattavalle kemikaalille.

Kertymävakio (K_1) on numeerinen arvo, joka määrittelee testattavan aineen pitoisuuden lisääntymisen nopeuden kalassa tai kalan pinnalla (tai sen tietyssä kudoksessa), kun kalat altistetaan kyseiselle kemikaalille (k_1:n laatu on päivää$^{-1}$).

Poistumavaihe (altistuksen jälkeinen vaihe) on se ajanjakso (sen jälkeen kun testattavat kalat on siirretty testattavaa ainetta sisältävästä väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole kyseistä ainetta), jonka aikana kyseisen aineen (netto)poistumaa testattavista kaloista (tai niiden tietyistä kudoksista) tutkitaan.

Poistumavakio (k_2) on numeerinen arvo, joka kuvaa testattavan aineen pitoisuuden alenemisen nopeutta kalassa (tai sen tietyssä kudoksessa), kun kalat on siirretty testattavaa ainetta sisältävästä väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole kyseistä ainetta (k_2:n laatu on päivää[1]).

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testissä on kaksi vaihetta: kertymävaihe (altistusvaihe) ja poistumavaihe (altistuksen jälkeinen vaihe). Kertymävaiheessa yhtä lajia olevat erilliset kalaryhmät altistetaan vähintään kahdelle testattavan aineen pitoisuudelle. Kalat siirretään tämän jälkeen poistumavaihetta varten sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole testattavaa ainetta. Kokeessa on aina oltava poistumavaihe, ellei aineen kertyminen kertymisvaiheen aikana ole ollut mitättömän pieni (esim. BCF alle 10). Testattavan aineen pitoisuutta kalassa tai kalan pinnalla (tai sen tietyssä kudoksessa) seurataan testin molempien vaiheiden aikana. Kahden testipitoisuuden lisäksi pidetään kalojen vertailuryhmää samoissa olosuhteissa (lukuun ottamatta testattavan aineen läsnäoloa), jotta biokertyvyyskokeessa mahdollisesti havaittavia haitallisia vaikutuksia voidaan verrata vertailukelpoiseen vertailuryhmään ja jotta saadaan testattavan aineen taustapitoisuudet.

▼B

Kertymisvaihe on 28 vuorokautta, jollei osoiteta, että tasapainotila on saavutettu aikaisemmin. Kertymisvaiheen kestoa ja tasapainotilan saavuttamiseen tarvittavaa aikaa voidaan ennustaa liitteessä 3 olevan yhtälön avulla. Poistumavaihe aloitetaan siirtämällä kalat puhtaaseen kammioon samaan väliaineeseen, jossa ei ole testattavaa ainetta. Biokertyvyystekijä lasketaan mahdollisuuksien mukaan sekä kalassa olevan pitoisuuden C_f ja vedessä olevan pitoisuuden C_w suhteena (BCF_{SS}), kun tasapainotila näyttää olevan saavutettu, että kineettisenä biokertyvyystekijänä (BCF_K) kertymävakion k_1 ja poistuma-vakion k_2 suhteena, kun oletetaan, että reaktio noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Jos on ilmeistä, että reaktio ei noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, olisi käytettävä monimutkaisempia malleja (liite 5).

Jos tasapainotilaa ei ole saavutettu 28 vuorokaudessa, kertymavaihetta on pidennettävä, kunnes tasapainotila saavutetaan, tai 60 vuorokauteen, sen mukaan, kumpi on ensin; minkä jälkeen aloitetaan poistumavaihe.

Kertymävakio, poistumavakio (tai vakiot, jos käytetään monimutkaisempia malleja), biokertyvyystekijä ja mahdollisuuksien mukaan näiden muuttujien luottamusvälit lasketaan mallista, joka parhaiten kuvaa testattavan aineen mitattuja pitoisuuksia kaloissa ja vedessä.

BCF ilmaistaan kalan kokonaismärkäpainoa kohti. Erityissyistä voi kuitenkin käyttää tiettyjä kudoksia tai elimiä (esim. lihas, maksa), jos kala on riittävän suurikokoinen tai jos se voidaan jakaa syötävään (filee) ja syömäkelvottomaan (sisälmykset) osaan. Koska monien orgaanisten aineiden biokertyvyyspotentiaalin ja lipofiilisyyden välillä on selvä suhde, on myös testattavan kalan rasvapitoisuuden ja kyseisten aineiden havaitun biokertyvyyden välillä vastaava suhde. Jotta tästä johtuvaa testitulosten vaihtelua hyvin lipofiilisten aineiden ($\log P_{ow} > 3$) osalta voidaan pienentää, biokertyvyys olisi ilmaistava sekä rasvapitoisuutta että kokonaiselopainoa kohti.

Rasvapitoisuus olisi mahdollisuuksien mukaan määritettävä samasta biologisesta aineksesta, jota käytetään testattavan aineen pitoisuuden määrittämiseksi.

1.4 TESTATTAVAA AINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Ennen biokertyvyystestin suorittamista pitäisi testattavasta aineesta olla käytettävissä seuraavat tiedot:

a) aineen vesiliukoisuus

b) oktanoli-vesi-jakautumiskerroin P_{ow} (josta käytetään myös merkintää K_{ow}, ja joka määritetään HPLC-menetelmällä, liite A.8)

c) hydrolyysi

d) valomuuntuminen vedessä määritettynä oikeassa tai jäljitellyssä auringonvalossa ja samoissa säteilyolosuhteissa kuin ne, joissa biokertyvyyskoe tehdään (3)

▼B

e) pintajännitys (aineet, joiden log P_{ow}:ta ei voida määrittää)

f) höyrynpaine

g) nopea biologinen hajoavuus (tapauksen mukaan).

Muita tarvittavia tietoja ovat toksisuus testissä käytettävälle kalalajille, mieluiten asymptoottinen (ajasta riippumaton) LC_{50}. Koeliuoksissa ja biologisessa aineksessa olevan testattavan aineen kvantifioimiseksi täytyy olla käytettävissä sopiva määritysmenetelmä, jonka tarkkuus, täsmällisyys ja herkkyys tunnetaan, ja samoin on oltava olemassa näytteen valmistusta ja säilyttämistä koskevat yksityiskohtaiset tiedot. Testattavan aineen määritysraja sekä vedessä että kalan kudoksissa pitäisi myös olla tiedossa. Käytettäessä ^{14}C-merkittyä testattavaa ainetta on tunnettava epäpuhtauksiin liittyvän radioaktiivisuuden prosenttiosuus.

1.5 TESTIN LUOTETTAVUUS (VALIDITEETTI)

Testi on luotettava (validi), jos

— lämpötilavaihtelu on vähemmän kuin ± 2 °C,

— liuenneen hapen pitoisuus ei laske alemmaksi kuin 60 % kyllästy misarvosta,

— testattavan aineen pitoisuus testauskammiossa pidetään 20 prosentin rajoissa kertymävaiheessa mitattujen arvojen keskiarvosta,

— kuolleisuus tai muut haitalliset vaikutukset tai sairaudet sekä vertailu- että koekaloissa on alle 10 % testin lopussa; jos koe kestää useita viikkoja tai kuukausia, kuolleisuuden tai muiden haitallisten vaikutuksien olisi oltava molemmissa ryhmissä alle 5 % kuukautta kohti, eikä se saisi kaikkiaan olla enemmän kuin 30 %.

1.6 VERTAILUAINEET

Tunnetun biokertyvyyskyvyn omaavien vertailuyhdisteiden käyttö olisi hyödyllistä koejärjestelyjen tarkistamiseksi tarvittaessa. Vielä ei kuitenkaan voida suositella mitään tiettyjä aineita.

1.7 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.7.1 *Laitteisto*

Missään laitteiston osissa ei saisi käyttää materiaaleja, jotka voivat liueta, sorboitua tai uuttua ja vaikuttaa kaloihin haitallisesti. Tavallisia laatikon- tai lieriönmuotoisia säiliöitä, jotka on tehty kemiallisesti inertistä aineesta ja jotka ovat kooltaan sopivia syöttönopeus huomioon ottaen, voidaan käyttää. Pehmeää muoviletkua pitäisi käyttää mahdollisimman vähän. Mieluummin käytetään teflonista (R), ruostumattomasta teräksestä ja/tai lasista valmistettua putkea/letkua. Kokemus on osoittanut, että aineille, joilla on korkea adsorptiokorroin, kuten synteettiset pyretroidit, voi olla tarpeen käyttää silanoitua lasia. Tällöin välineet on heitettävä pois käytön jälkeen.

▼B

1.7.2 *Vesi*

Testissä käytetään yleensä luonnon vettä, jonka on oltava pilaantumatonta ja laadultaan tasaista. Laimennusveden on oltava laadultaan sellaista, että kokeeseen valitut kalat elävät siinä totuttautumis-vaiheen ja testin aikana ilman, että niiden ulkonäössä tai käyttäytymisessä havaitaan mitään epänormaalia muutosta. Olisi ihanteellista pystyä osoittamaan, että koelaji elää, kasvaa ja lisääntyy laimennus-vedessä (esim. laboratoriokasvatuksessa tai koko sukupolven kierron käsittävässä toksisuustestissä). Vedestä on tunnettava ainakin pH, kovuus, kiinteiden aineiden kokonaispitoisuus, orgaanisissa yhdisteissä olevan hiilen kokonaismäärä ja mieluiten myös ammoniumioni- ja nitriittipitoisuus sekä emäksisyys ja merieliöiden osalta suolapitoisuus. Kalojen hyvinvoinnille tärkeät tekijät tunnetaan hyvin, mutta liitteessä 1 annetaan suositeltavat enimmäispitoisuudet useille makean ja meriveden testivesien muuttujille.

Veden laadun on oltava tasainen testin ajan. pH-arvo voi olla 6,0–8,5, mutta vaihtelun on pysyttävä tietyn testin ajan 0,5 pH-yksikön sisällä. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa ainetta) tai vaikuta haitallisesti kalakannan vointiin, näytteitä olisi otettava säännöllisin väliajoin määrityksiä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), torjunta-aineet (esim. orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoitunect kiinteät aineet olisi määritettävä esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrityksiä voidaan tehdä harvemmin (esim. kuuden kuukauden välein).

Luonnosta peräisin olevien hiukkasten samoin kuin orgaanisen hiilen kokonaismäärän (TOC) laimennusvedessä olisi oltava mahdollisimman alhainen, jotta testiaine ei absorboituisi orgaanisen aineen pintaan, mikä vähentäisi sen biologista hyötyosuutta (4). Suurin hyväksyttävä arvo on 5 mg/l hiukkasille (kuiva-aine, joka ei läpäise 0,45 μm:n suodatinta) ja 2 mg/l orgaanisen hiilen kokonaismäärälle (katso liite 1). Vesi on tarvittaessa suodatettava ennen käyttöä. Testattavista kaloista (ulosteet) ja ruoanjätteistä peräisin olevan orgaanisen hiilen määrän pitäisi olla mahdollisimman alhainen. Koko testin aikana orgaanisen hiilen pitoisuus testausastiassa ei saa ylittää testattavasta aineesta ja mahdollisesti käytetystä liuotusaineesta peräisin olevaa pitoisuutta yli 10 milligrammalla litraa kohti (± 20 %).

1.7.3 *Testiliuokset*

Testattavasta aineesta tehdään kantaliuos, jonka pitoisuus on sopiva. Kantaliuos valmistetaan mieluiten joko sekoittamalla tai sekoittamalla voimakkaasti testattava aine laimennusveteen. Liuottimien tai liuotusaineiden (dispergoivien aineiden) käyttöä ei suositella. Niitä voi kuitenkin joskus käyttää, jotta saadaan tehdyksi väkevä kantaliuos. Sallittuja liuottimia ovat etanoli, metanoli, etyleeniglykolimonometyylieetteri, etyleeniglykolidimetyylieetteri, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sallittuja liuotusaineita ovat Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metyyliselluloosa ja HCO-40. Helposti biohajoavia aineita käytettäessä on oltava varovainen, koska ne voivat aiheuttaa ongelmia bakteerikasvuston takia läpivirtaustesteissä. Testattava aine voi olla leimattu radioaktiivisella aineella ja sen pitäisi olla mahdollisimman puhdasta kemiallisesti (mielellään esimerkiksi yli 98-prosenttista).

▼B

Läpivirtaustestissä on käytettävä testattavan aineen kantaliuosta jatkuvasti annostelevaa ja laimentavaa järjestelmää (esim. annostelupumppua, laimenninta, kyllästävää järjestelmää) testipitoisuuksien annostelemiseksi testikammioihin. Testikammioiden veden pitäisi vaihtua mielellään ainakin viisi kertaa vuorokaudessa. Läpivirtausmalli on paras, mutta jos sitä ei voida käyttää (jos se esimerkiksi haittaa testattavia eliöitä), voidaan käyttää puolistaattista järjestelmää, mikäli validiteettikriteerit täyttyvät. Kantaliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava sekä 48 h ennen testiä että vähintään kerran päivässä testin aikana. Tässä tarkistuksessa mitataan myös läpivirtausnopeus kaikissa testikammioissa ja varmistetaan, ettei se vaihtele yli 20 %:a yhdessä kammiossa tai kammioiden välillä.

1.7.4 *Lajin valinta*

Tärkeitä perusteita lajin valinnassa ovat se, että lajia on helposti saatavilla, sitä voi saada sopivan kokoisina yksilöinä ja sitä voidaan helposti ylläpitää laboratoriossa. Muita perusteita kalalajin valitsemiselle voivat olla virkistyskäyttö, kaupallinen tai ekologinen merkitys sekä samanlainen herkkyys, onnistunut käyttö aikaisemmin ym.

Suositeltavat lajit luetellaan liitteessä 2. Muita lajeja voidaan käyttää, mutta testausmenetelmää voi joutua muuttamaan siten, että saadaan sopivat koeolosuhteet. Tällaisessa tapauksessa olisi selostettava syyt lajin valitsemiseen ja koemenetelmä.

1.7.5 *Kalojen olosuhteet testauskammioissa*

Kalojen kantapopulaatiota totutetaan vähintään kahden viikon ajan testauslämpötilassa ja kaloja ruokitaan riittävästija samantyyppisellä rehulla kuin se, jota annetaan testin aikana.

Kuolleiden kalojen määrä kirjataan 48 tunnin alkutotuttelun jälkeen, jonka jälkeen noudatetaan seuraavia periaatteita:

— jos kuolleita kaloja on yli 10 % populaatiosta seitsemän vuorokauden aikana, koko erä hylätään,

— jos kuolleita kaloja on 5–10 % populaatiosta seitsemän vuorokauden aikana, kaloja totutetaan vielä seitsemän vuorokautta,

— jos kuolleita kaloja on alle 5 % populaatiosta seitsemän vuorokauden aikana, erä hyväksytään, mutta jos kuolleita on yli 5 % seuraavien seitsemän vuorokauden aikana, koko erä hylätään.

On tarkastettava, ettei testeissä käytettävissä kaloissa ole havaittavia tauteja tai poikkeavuuksia. Sairaat kalat on heitettävä pois. Kaloja ei saisi hoitaa sairauden takia kahden viikon aikana ennen testiä tai testin aikana.

▼B

1.8 TESTIN SUORITTAMINEN

1.8.1 *Esitesti*

Voi olla hyvä tehdä esitesti lopullisen kokeen olosuhteiden optimoimiseksi, esim. testattavan aineen pitoisuuden (pitoisuuksien) valitseminen, kertymä- ja poistumavaiheen kesto.

1.8.2 *Altistumisolosuhteet*

1.8.2.1 Kertymävaiheen kesto

Kertymävaiheen kestoa voi arvioida käytännön kokemuksen perusteella (esim. aiemmasta kemikaalin kertyvyystutkimuksesta) tai tietyistä kokemusperäisistä suhteista käyttämällä joko testattavan aineen vesiliukoisuutta tai oktanoli-vesi-jakaantumiskerrointa koskevia tietoja (ks. liite 3).

Kertymävaiheen on kestettävä 28 vuorokautta, ellei voida osoittaa, että tasapainotila on saavutettu aikaisemmin. Jos tasapainotilaa ei ole saavutettu 28 vuorokauden kuluessa, kertymävaihetta jatketaan ja mittauksia tehdään, kunnes tasapainotila saavutetaan tai 60 vuorokautta on kulunut, sen mukaan, kumpi tapahtuu aiemmin.

1.8.2.2 Poistumavaiheen kesto

Puolet kertymävaiheesta riittää tavallisesti asianmukaiseen (esim. 95 %) vähenemiseen kalaan kertyneessä aineessa (katso liite 3, arvioinnin selostus). Jos 95 prosentin vähenemiseen pääseminen kestää erittäin kauan, esimerkiksi yli kaksi kertaa kertymävaiheen normaali kesto (ts. yli 56 vuorokautta), voidaan hyväksyä lyhyempi aika (ts. kunnes testattavan aineen pitoisuus on alle 10 % tasapainotilasta). Jos aineen kertymä- ja poistumakinetiikka on monimutkaisempi kuin yhden osaston mallissa, jota voidaan kuvata ensimmäisen asteen kinetiikalla, on poistumavaiheen oltava pitempi poistumavakion määrittämiseksi. Tämä aika voidaan kuitenkin määrätä esim. sen perusteella, kuinka kauan testattavan aineen pitoisuus kalassa pysyy määritysrajan yläpuolella.

1.8.2.3 Testikalojen määrä

Kalojen lukumäärän jokaista testipitoisuutta kohti on oltava sellainen, että on saatavilla vähintään neljä kalaa näytettä kohti. Jos tarvitaan suurempaa tilastotehoa, tarvitaan enemmän kaloja näytettä kohti.

Jos käytetään täysikasvuisia kaloja, ilmoitetaan, ovatko ne koiraita, naaraita vai molempia. Jos käytetään molempia sukupuolia, on osoitettava ennen totuttautumisvaihetta, että erot rasva-ainepitoisuudessa sukupuolien välillä ovat merkityksettömät. Määritystä varten voi olla tarpeen yhdistää kaikki koiraat ja kaikki naaraat.

▼B

Jokaiseen testiin on valittava samanpainoisia kaloja, jolloin pienimpien on painettava vähintään kaksi kolmasosaa suurimmista. Kaikkien pitäisi olla samaa vuosiluokkaa ja peräisin samasta lähteestä. Koska paino ja ikä näyttävät vaikuttavan joskus merkittävästi BCF-arvoihin (1), on ne kirjattava tarkasti. Suositellaan, että osa näytekaloista punnitaan ennen testiä keskipainon arvioimiseksi.

1.8.2.4 Kalojen lastaaminen testikammioon

Vesimäärän on oltava suuri suhteessa kalojen määrään, jotta C_w laskee mahdollisimman vähän, kun kalat lisätään kammioon testin alussa, ja myös siksi, ettei liuenneen hapen pitoisuus laske. On tärkeää, ettei kaloja lisätä kammioon liian nopeasti. Joka tapauksessa lastausnopeudeksi suositellaan normaalisti 0,1–1,0 g kalaa (märkäpainona) litraa vettä kohti vuorokaudessa. Lastaus voidaan tehdä nopeammin, jos osoitetaan, että testattavan aineen pitoisuus voidaan pitää nimellisarvossa ± 20 prosenttia eikä liuenneen hapen pitoisuus laske alemmaksi kuin 60 prosenttia kyllästyneisyysarvosta.

Valittaessa sopiva lastaustapa on otettava huomioon kalalajin luonnollinen elinympäristö. Esimerkiksi pohjakalat voivat vaatia samaa vesitilavuutta kohti suuremman pohjapinta-alan kuin pelagiset kalalajit.

1.8.2.5 Ruokkiminen

Totuttamisvaiheessa ja testin aikana kalojen ravinnossa noudatetaan ruokavaliota, jonka rasvapitoisuus ja valkuaisaineiden kokonaispitoisuus tunnetaan. Rehua annetaan riittävästi niin, että kalat pysyvät terveinä ja niiden paino ei laske. Rehua annetaan päivittäin totuttamisvaiheessa ja testin aikana noin 1–2 % kalan painosta vuorokaudessa. Tällöin useimpien kalalajien rasvapitoisuus pysyy suhteellisen vakiona testin aikana. Rehun määrä olisi laskettava uudelleen esimerkiksi kerran viikossa, jotta kalan paino ja rasvapitoisuus pysyisivät samana. Tässä laskutoimituksessa kussakin kammiossa olevien kalojen paino voidaan arvioida viimeksi kyseisestä kammiosta näytteeksi otetun kalan painosta. Kammiossa olevia kaloja ei punnita.

Syömättä jäänyt rehu ja ulosteet poistetaan testikammioista päivittäin vähän ruokinnan jälkeen (30 minuuttia – 1 tunti). Kammiot pidetään mahdollisimman puhtaina koko testin ajan, jotta orgaanisen aineksen pitoisuus pysyy mahdollisimman alhaisena, koska orgaaninen hiili saattaa vaikuttaa haitallisesti testattavan aineen biologiseen hyötyosuuteen (1).

Koska monet rehut on valmistettu kalajauhoista, on määritettävä, onko rehussa testattavaa ainetta. On suotavaa määrittää myös, onko rehussa torjunta-aineita ja raskasmetalleja.

▼B

1.8.2.6 Valo ja lämpötila

Valoisa aika on tavallisesti 12–16 tuntia. Lämpötilan pitäisi olla kalalajille sopiva eikä se saisi vaihdella enempää kuin ± 2 ºC. Valaistuksen tyyppi ja ominaisuudet on tunnettava. Testattavan aineen mahdollinen muuntuminen tutkimuksen säteilyolosuhteissa on otettava huomioon. Valaistusolosuhteiden olisi oltava asianmukaiset, ja on vältettävä kalojen altistumista epäluonnolliselle valolle. Joskus voi olla tarpeen suodattaa pois alle 290 nm:n UV-säteily.

1.8.2.7 Testipitoisuudet

Kalat altistetaan läpivirtausolosuhteissä vähintään kahdelle testattavan aineen pitoisuudelle vedessä. Tavallisesti valitaan korkeampi (tai korkein) testattavan aineen pitoisuus siten, että se on noin 1 % aineen akuutista asymptoottisesta LC_{50}-arvosta ja vähintään 10 kertaa korkeampi kuin sen havaitsemis-raja vedessä käytettävällä määritysmenetelmällä.

Korkein testipitoisuus voidaan myös määrittää jakamalla akuutti 96 tunnin LC_{50}-arvo asianmukaisella akuutti/krooninen-suhteella (asianmukaiset suhteet joillekin kemikaaleille voivat olla noin 3–100). Jos se on mahdollista, valitaan toinen pitoisuus (toiset pitoisuudet) siten, että sen ero edelliseen pitoisuuteen on kymmenkertainen, jos tämä ei ole mahdollista, kun otetaan huomioon kriteeri ”1 % LC_{50}-arvosta” ja määritysraja, voidaan käyttää pienempää tekijää kuin 10 tai harkita ^{14}C-leimatun aineen käyttöä. Mikään testipitoisuus ei saa olla suurempi kuin testattavan aineen liukoisuus.

Jos käytetään liuotusainetta, sen pitoisuus ei saisi olla suurempi kuin 0,1 ml/l, pitoisuuden on oltava sama kaikissa testiastioissa. Sen osuus orgaanisen hiilen kokonaismäärästä, samoin kuin testattavan aineen osuus, on tunnettava. Näitä aineita on kuitenkin pyrittävä välttämään mahdollisimman täydellisesti.

1.8.2.8 Kontrollit

Testisarjan lisäksi on tehtävä yksi kontrolli laimennusvedellä tai — jos liuotusainetta on käytetty — yksi kontrolli, jossa on liuotusainetta, jos on osoitettu, ettei liuotusaine vaikuta kaloihin. Ellei tätä ole osoitettu, on tehtävä molemmat kontrollit.

1.8.3 *Veden laatua koskevien mittausten taajuus*

Testin aikana on mitattava liuennut happi, TOC (orgaanisen hiilen kokonaismäärä), pH ja lämpötila kaikista astioista. Veden kokonaiskovuus ja suola, mikäli se on aiheellista, mitataan kontrolleista ja yhdestä astiasta, jossa on korkeampi (korkein) pitoisuus. Vähintään on mitattava kolme kertaa liuennut happi ja suola, mikäli aiheellista (alussa, kertymävaiheen keski- ja loppuvaiheessa) ja kerran viikossa poistumavaiheen aikana. TOC on mitattava testin alussa (24 ja 48 tuntia ennen kertymävaiheen alkua), ennen kalojen lisäämistä astiaan ja vähintään kerran viikossa sekä kertymä- että poistumisvaiheen aikana. Lämpötila on mitattava joka päivä, pH kunkin vaiheen alussa ja lopussa ja kovuus kerran testin aikana. Lämpötilaa olisi mieluiten mitattava jatkuvasti vähintään yhdessä astiassa.

▼B

1.8.4 *Näytteenotto ja mittaukset kaloista ja vedestä*

1.8.4.1 Näytteenoton aikataulu

Testattavan aineen pitoisuuden määrittämiseen käytetyistä testauskammioista otetaan vesinäyte ennen kalojen lisäystä sekä kertymä- ja poistumisvaiheen aikana. Vedestä on otettava näytteet vähintään samoina aikoina kuin kaloista ja ennen ruokkimista. Kertymävaiheen aikana määritetään testattavan aineen pitoisuudet sen tarkistamiseksi, täyttyvätkö validiteettikriteerit.

Kaloista otetaan näyte ainakin viidesti kertymävaiheen aikana ja neljästi poistumavaiheen aikana. Koska voi olla joskus vaikea laskea kohtuullisen tarkkaa arviota BCF-arvosta tämän näytemäärän perusteella (erityisesti, jos näyttää siltä, että poistuma noudattaa muuta kuin yksinkertaista ensimmäisen asteen kinetiikkaa), voi olla suositeltavaa ottaa näytteitä tiheämmin molemmissa vaiheissa (katso liite 4). Ylimääräiset näytteet säilytetään ja analysoidaan vain, jos ensimmäisen analyysikierroksen tulokset osoittautuvat riittämättömiksi BCF:n laskemiseksi halutulla tarkkuudella.

Hyväksyttävästä näytteenottoaikataulusta on esimerkki liitteessä 4. Muunlaisia aikatauluja voi laskea helposti käyttäen muita oletettuja P_{ow}-arvoja 95 prosentin kertymään tarvittavan altistusajan laskemiseksi.

Näytteenottoa jatketaan kertymävaiheen aikana, kunnes saavutetaan tasapainotila tai 28 vuorokauden ajan, kumpi tapahtuu aikaisemmin. Jos tasapainotilaa ei ole saavutettu 28 vuorokauden kuluessa, näytteenottoa jatketaan, kunnes tasapainotila saavutetaan tai 60 vuorokauden ajan, sen mukaan, kumpi tapahtuu aikaisemmin. Ennen poistumisvaiheen aloittamista kalat siirretään puhtaisiin kammioihin.

1.8.4.2 Näytteenotto ja näytteiden valmistus

Vesinäytteet otetaan esimerkiksi lapolla inertin putken/letkun kautta kammion keskivaiheilla olevasta kohdasta. Koska sen enempää suodatuksella kuin sentrifugoinnillakaan ei aina ilmeisesti voida erottaa toisistaan niitä testattavan aineen osia, joita kala ei biohyödynnä ja joita se biohyödyntää (erityisesti superlipofiilisten kemikaalien, ts. kemikaalien, joiden log $P_{ow} > 5$) osalta) (1) (5), näytteille ei tarvitse välttämättä tehdä näitä toimenpiteitä.

Sen sijaan on huolehdittava siitä, että kammiot pidetään mahdollisimman puhtaina, ja orgaanisen hiilen kokonaismäärää on seurattava sekä kertymä- että poistumavaiheessa.

Sopiva määrä kaloja (normaalisti vähintään neljä) otetaan testikammioista kutakin näytettä varten. Näytteeksi otetut kalat huuhdellaan nopeasti vedellä, kuivataan (pyyhkeellä), tapetaan välittömästi sopivimmalla ja inhimillisimmällä tavalla ja punnitaan.

On suositeltavaa tehdä määritykset kaloista ja vedestä heti näytteenoton jälkeen, jotta ei tapahtuisi hajoamista tai muuta ainehävikkiä ja jotta voidaan laskea likimääräiset kertymä- ja poistumanopeudet testin edetessä. Kun näytteet määritetään heti, voidaan myös nähdä nopeasti, milloin tasapainotila on saavutettu.

▼B

Jos näytteitä ei voi määrittää heti, ne säilytetään sopivalla tavalla. Ennen testin aloittamista on hankittava tietoja kyseisen testattavan aineen oikeasta säilytystavasta, esimerkiksi pakastamisesta, säilyttämisestä 4 °C:ssa, säilytysajasta, uuttamisesta jne.

1.8.4.3 Määritysmenetelmän laatu

Koska koko menetelmä riippuu olennaisesti testattavan aineen määritykseen käytettävän menetelmän tarkkuudesta, täsmällisyydestä ja herkkyydestä, on todettava kokeellisesti, että kyseisessä menetelmässä kemiallisen määrityksen täsmällisyys ja toistettavuus samoin kuin testattavan aineen saalis sekä vedestä että kaloista ovat tyydyttäviä. On myös tarkastettava, ettei testattavaa ainetta ole laimennukseen käytetyssä vedessä mitattavia määriä.

Tarvittaessa testissä saadut C_w- ja C_f-arvot korjataan kontrollien saaliin ja tausta-arvojen suhteen. Kalaja vesinäytteitä käsitellään koko ajan siten, että kontaminoituminen ja hävikki (joka voi johtua esimerkiksi adsorboitumisesta näytteenottolaitteistoon) ovat mahdollisimman pienet.

1.8.4.4 Kalanäytteistä tehtävät määritykset

Jos testissä käytetään radioaktiivisia merkkiaineita, on mahdollista määrittää kokonaisradioaktiivisuus (ts. perusyhdiste ja siitä syntyneet aineenvaihduntatuotteet) tai näytteet voidaan puhdistaa siten, että perusyhdiste voidaan määrittää erikseen. Myös tärkeimmät aineenvaihduntatuotteet voidaan karakterisoida tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopussa, sen mukaan, kumpi tapahtuu aikaisemmin. Jos BCF on ≥ 1 000 % ilmaistuna radioaktiivisten jäämien kokonaismääränä, voi olla suositeltavaa — ja tiettyihin luokkiin kuuluvien kemikaalien kuten torjunta-aineiden ollessa kyseessä erittäin suositeltavaa — tunnistaa ja määrittää kvantitatiivisesti hajoamistuotteet, joiden määrä on > 10 % kalan kudoksissa tasapainotilassa olevista jäämistä. Jos kaloista tunnistetaan ja määritetään kvantitatiivisesti ≥ 10 %:n luokkaa olevia hajoamistuotemääriä, niin on suositeltavaa tunnistaa ja määrittää kvantitatiivisesti hajoamistuotteet myös testivedestä.

Testattavan aineen pitoisuus olisi tavallisesti määritettävä kustakin yksittäisestä punnitusta kalasta. Jos tämä ei ole mahdollista, voidaan samaan aikaan otetut näytekalat yhdistää, mutta yhdistäminen rajoittaa tilastomenetelmiä, joita voidaan käyttää tulosten käsittelyyn. Jos on tärkeää, että käytetään tiettyä ja tietyn tehoista tilastollista menetelmää, pitäisi testissä olla riittävä määrä kaloja, jotta haluttu kalojen yhdistäminen ja tilastollinen teho voidaan ottaa huomioon (6) (7).

BCF pitäisi ilmaista sekä kokonaismärkäpainoa kohti että erittäin lipofiilisten aineiden osalta myös rasvapitoisuutta kohti. Kalojen rasvapitoisuus määritetään jokaisen näytteenoton yhteydessä, jos mahdollista. Sopivia menetelmiä on käytettävä rasvapitoisuuden määrittämiseksi (liitteessä 3 olevat viitteet 8 ja 2). Kloroformi-metanoliuuttoa voi suositella standardimenetelmänä (9). Eri menetelmillä ei saada samoja arvoja (10), joten on tärkeää kuvailla käytetty menetelmä. Aina kun se on mahdollista, rasvat olisi määritettävä samasta uutteesta, josta testattava aine määritetään, koska rasvat täytyy usein poistaa uutteesta ennen kuin sitä voi käyttää kromatografiseen määritykseen. Kalan rasvapitoisuus (mg/kg märkäpainoa kohti) kokeen lopussa ei saisi poiketa rasvapitoisuudesta kokeen alussa enempää kuin *±25* %. Kudoksen kiinteän aineen prosenttiosuus pitää myös ilmoittaa, jotta rasvapitoisuus voidaan muuntaa märkäarvosta kuiva-arvoksi.

▼B

2. **MÄÄRITYSTULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Testattavan aineen kertymäkäyrä saadaan esittämällä kalassa tai kalan pinnalla (tai määritellyissä kudoksissa) kertymävaiheen aikana olevan aineen pitoisuus ajan funktiona aritmeettisella asteikolla, jos käyrä osoittaa tasapainotilaa (ts. käyrä on suunnilleen asymptoottinen aika-akselin kanssa), tasapainotilaa vastaava BCF_{ss} lasketaan kaavasta

$$\frac{C_f \text{as steady} - \text{state(mean)}}{C_w \text{as steady} - \text{state(mean)}}$$

Jos tasapainotilaa ei saavuteta, voi olla mahdollista laskea vaarallisuuden arviointiin riittävän tarkka BCF_{SS} 80 (1,6/kJ prosentin tai 95 prosentin ($3,0/k_2$)”tasapainon” perusteella.

Myös konsentraatiotekijä (BCF_k) määritetään kahden ensimmäisen asteen kineettisen vakion suhteena (k_1/k_2). Poistumisvakio (k_2) määritetään tavallisesti poistumakäyrästä (ts. käyrästä, joka kuvaa testattavan aineen pitoisuuden vähenemistä kalassa ajan funktiona). Kertymävakio (k_1) lasketaan sitten, kun tunnetaan k_2 ja jokin kertymäkäyrästä saatu C_f:n arvo, (katso myös liite 5). Paras menetelmä BCF_k:n ja nopeusvakioiden k_1 ja k_2 laskemiseksi on estimoida tietokoneella epälineaariset parametrit (11). Muuten voidaan käyttää graafisia menetelmiä k_1 ja k_2:n määrittämiseksi. Jos poistumakäyrä ei selvästikään noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, pitäisi käyttää monimutkaisempia malleja (katso liitteessä 3 olevat viitteet) ja pyytää neuvoa biostatistiikan asiantuntijoilta.

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Tulosten tulkinnassa on oltava varovainen, jos testiliuoksista mitatut tulokset ovat lähellä määritysmenetelmän havaitsemisrajaa.

Selvät kertymä- ja poistumakäyrät osoittavat hyviä biokonsentraatiotuloksia. Vaihtelun kertymä/poistu-mavakioissa kahden testi pitoisuuden välillä pitäisi olla alle 20 %. Jos havaitaan merkittäviä eroja kertymä-/poistumanopeuksien välillä käytettyjen kahden testipitoisuuden välillä, ne on kirjattava ja selitettävä, jos voidaan. BCF:ien luotettavuusväli hyvin suunnitelluissa kokeissa on yleensä lähellä ± 20:tä prosenttia.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

Testiraportissa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

3.1 TESTATTAVA AINE

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä;

— kemialliset tunnistetiedot (mukaan lukien orgaanisen hiilen pitoisuus tarvittaessa);

— jos aine on radioaktiivisesti leimattu, leimatun atomin (leimattujen atomien) tarkka sijainti ja epäpuhtauksiin liittyvän radioaktiivisuuden määrä.

▼B

3.2 TESTATTAVA LAJI

— tieteellinen nimi, kanta, lähde, mahdollinen esikäsittely, totuttamistiedot, ikä, koko jne.

3.3 TESTIOLOSUHTEET

— käytetty testimenettely, esim. läpivirtaus- tai puolistaattinen;

— käytetty valaistustyyppi ja valon ominaisuudet sekä valoperiodi(t);

— testimenetelmän kuvaus, esim. testikammioiden lukumäärä ja koko, veden vaihtumisnopeus, rinnakkaisnäytteiden määrä, kalojen lukumäärä nnnakkaisnäytteessä, testipitoisuuksien lukumäärä, kertymä- ja poistumavaiheiden kesto, kala- ja vesinäytteiden näytteenottotaajuus;

— kantaliuosten valmistus ja niiden uusimistaajuus (liuotusaine ja sen pitoisuus sekä sen osuus testivedessä olevan orgaanisen hiilen kokonaismäärästä on ilmoitettava, jos liuotusainetta käyte tään);

— nimelliset testipitoisuudet, testikammioissa mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat ja menetelmä, jolla ne on laskettu;

— laimennusveden alkuperä, mahdolliset esikäsittelyt, osoitukset kalojen kyvystä elää tässä vedessä sekä vettä koskevat tiedot: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännöskloorin tasot (jos ne on mitattu), orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus, suspensiossa olevat kiinteät aineet, testiväliaineen suolapitoisuus (jos aiheellista) ja muut mahdolliset mittaukset;

— testikammioissa olevan veden laatu, pH, kovuus, TOC, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus;

— yksityiskohtaiset tiedot ruokkimisesta (esim. rehutyyppi, sen alkuperä, koostumus — vähintään rasva- ja valkuaisainepitoisuus mahdollisuuksien mukaan, annetut määrät ja syöttötaajuus);

— kala- ja vesinäytteiden käsittelyä koskevat tiedot, mukaan lukien testattavan aineen valmistusta, säilyttämistä, uuttamista ja määritysmenetelmiä (ja niiden täsmällisyyttä) sekä rasvapitoisuutta koskevat tiedot (JOS on mitattu).

3.4 TULOKSET:

— mahdollisista esikokeista saadut tulokset;

— vertailukalojen ja kussakin altistuskammiossa olevien kalojen kuolleisuus sekä mahdollinen tavalli suudesta poikkeava käyttäytyminen;

— kalojen rasvapitoisuus (jos se on määritetty testin yhteydessä);

— testattavan kemikaalin kertymää ja poistumaa kuvaavat käyrät (mukaan lukien kaikki mittaustu lokset) ja tasapainotilan saavuttamiseen tarvittu aika;

▼B

— C_t ja C_w (sekä keskihajonta ja vaihteluväli, jos aiheellista) kaikkien näytteenottoaikojen osalta (C_1 ilmaistuna mikrogrammoina grammaa märkäpainoa kohti tai ppm:inä koko kalaa tai sen tiettyjä kudoksia, esim. rasvakudosta kohti, ja C mikrogrammoina millilitraa kohti eli ppm:inä); C_w-arvot verrokkisarjalle (tausta) on myös ilmoitettava;

— tasapainotilassa mitattu biokonsentraatiotekijä (BCF_{ss}) ja/tai kineettinen konsentraatiotekijä (BCF_k) sekä mahdolliset 95 prosentin luotettavuusvälit kertymä- ja poistumavakioille (kaikki ilmaistuna eläimen tai sen tiettyjen kudosten kokonaispainoa tai kokonaisrasvapitoisuutta kohti, jos ne on mitattu), luotettavuusvälit ja keskihajonta, jos ovat saatavina, sekä tuloksiin sovellettu tietokone analyysi kullekin käytetylle testipitoisuudelle;

— jos on käytetty radioaktiivisesti leimattuja aineita, voidaan tarvittaessa esittää mahdollisten havait tujen aineenvaihduntatuotteiden kertymistä koskevat tiedot;

— mahdolliset epätavalliset tapahtumat testin aikana, poikkeamat näistä menettelyistä ja muut mahdolliset asiaan liittyvät tiedot.

On vältettävä ilmoittamasta ”ei havaittu havaitsemisrajalla”. Menetelmää ja koejärjestelyä on kehitettävä ennen testiä, koska edellä mainitunlaisia tuloksia ei voi käyttää nopeusvakioiden laskemiseen.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

(1) Connell D.W. *(1988).* Bioaccumulacion behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms.Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp 117–156.

(2) Bintein S., Devillers, J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, 2–390.

(3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No 3.

(4) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(1) (5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

(6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane Rockville, MD 20852, July 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5, A(l). Analysis of Human Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Recidues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

(8) Compaan H. (1980) in ”The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation”, Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands.

▼B

(9) Gardner et al. (1995). Limn. & Oceanogr. 30, 1099–1105.

(10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, pp 1431–1436.

(11) CEC. Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984–1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTME E-1022-84 (Reapproved 1988). Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼B

Liite 1

Hyväksyttävän laimennusveden kemialliset ominaisuudet

	Aine	Raja-pitoisuus
1	Kiinteät aineet/hiukkaset	5 mg/l
2	Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	2 mg/l
3	Ionisoitumaton ammoniakki	1 µg/1
4	Jäännöskloori	10 µg/l
5	Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	50 ng/l
6	Orgaanista klooria sisältävät torjunta-aineet ja polyklooratut bife-nyylit	50 ng/1
7	Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	25 ng/1
8	Alumiini	1 µg/l
9	Arseeni	1 µg/1
10	Kromi	1 ng/1
1 1	Koboltti	1 ng/1
12	Kupari	1 µg/l
13	Rauta	1 µg/l
14	Lyijy	1 µg/l
15	Nikkeli	1 µg/l
16	Sinkki	1 µg/l
17	Kadmium	100 ng/1
18	Elohopea	100 ng/1
19	Hopea	100 ng/1

▼B

Liite 2

Testaukseen suositellut kalalajit

	Suositeltu laji	Suositeltu lämpötilaväli (°C)	Suositeltu koe-eläimen kokonaispituus (cm)
1	*Danio rerio* [1]*(Teleostei, Cyprinidae)* (Hamilton-Buchanan) seeprakala	20–25	3,0 ± 0,5
2	*Pimepbales promelas (Teleostei, Cyprinidae)* (Rafinesque) paksupäämutu	20–25	5,0 ± 2,0
3	*Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae)* (Linnaeus) karppi	20–25	5,0 ± 3,0
4	*Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae)* (Temminck and Schlegel) (engl. ricefish)	20–25	4,0 ± 1,0
5	*Poecilia reticuIata (Teleostei, Poeciliidae)* (Peters) (engl. guppy)	20–25	3,0 ± 1,0
6	*Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae)* (Rafinesque) isoaurinkoahven	20–25	5,0 ± 2,0
7	*Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae)* (Walbaum) kirjolohi	13–17	8,0 ± 4,0
8	*Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae)* (Linnaeus) kolmipiikki	18–20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer A., Orti G. (1993} Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231.

Erilaisia suisto- ja merikalalajeja on käytetty eri maissa, esimerkiksi:

(engl.) Spot	*Leiostomus xanthurus*
(engl.) Sheepshead minnow	*Cyprinodon variegatus*
Hopeakylki	*Menidia beryllina*
(engl.) Shiner perch	*Cymatogaster aggregata*
(engl.) English sole, eräs kielikampela	*Parophrys vetulus*
Simppu	*Leptocottus armatus*
Kolmipiikki	*Gasterosteus aculeatus*
Meriahven	*Dicentraeus labrax*
Salakka	*AIburnus alburnus*

Kalojen saatavuus

Edellä olevassa taulukossa lueteltuja makean veden kaloja on helppo kasvattaa ja/tai niitä on helposti saatavissa läpi vuoden, kun taas meri- tai suistokalalajeja on lähinnä saatavissa vastaavissa maissa. Niitä voidaan kasvattaa joko kalanviljelylaitoksissa tai laboratorioissa taudeilta ja loisilta valvotuissa olosuhteissa niin, että saadaan terveitä koe-eläimiä, joiden alku/sukuperä tunnetaan. Näitä kaloja on saatavissa monissa osissa maailmaa.

▼B

Liite 3

Kertymä- ja poistumavaiheen keston arvioiminen

1. *Kertymdvaiheen keston arvioiminen*

Ennen testin suorittamista voidaan saada arvio k_2:sta ja siten jokin prosenttimäärä tasapainotilan saavuttamiseksi tarvittavasta ajasta, kun tunnetaan empiirisiä suhteita k_2:n ja n-oktanoli-vesi -jakautumiskertoimen (P_{ow}) tai k_2:n ja vesiliukoisuuden (s) välillä.

Arvio k_2:sta (vuorokautta[1]) saadaan esimerkiksi seuraavasta empiirisestä suhteesta:

$$\log_{10}k_2 = -0{,}414\ \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47\ (r^2 = 0{,}95) \qquad \text{(yhtälö 1)}$$

Muita suhteita on viitteessä (2).

Jos jakautumiskerrointa (P_{ow}) ei tunneta, voidaan tehdä arvio (3), jos tunnetaan aineen vesiliukoisuus (s):

$$\log_{10}(P_{ow}) = 0{,}862\ \log_{10}(s) + 0{,}710\ (r^2 = 0{,}994) \qquad \text{(yhtälö 2)}$$

jossa

s = liukoisuus (moolia/l): (n = 36).

Nämä suhteet koskevat vain kemiallisia aineita, joiden log P_{ow}-arvot ovat 2–6,5 (4).

Aika, joka tarvitaan jonkin prosenttiasteisen tasapainotilan saavuttamiseksi, voidaan saada k_2-arviota soveltamalla yleisestä kertymä- ja poistumavaihetta kuvaavasta yhtälöstä (ensimmäisen asteen kinetiikka):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

tai jos C_w on vakio:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{(yhtälö 3)}$$

Kun lähestytään tasapainotilaa (t — ∞), yhtälö 3 voidaan muuttaa (5) (6) seuraavasti:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \,.\, C_w \text{ or } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

Tällöin $k_1/k_2.C_w$ lähenee pitoisuutta kalassa ”tasapainotilassa” ($C_{t,\,s}$).

Yhtälö 3 voidaan kirjoittaa seuraavasti:

$$C_f = C_{f,s}(1 - e^{-k_2 t}) \text{ or } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{(yhtälö 4)}$$

Soveltamalla yhtälöä 4 voidaan arvioida jonkin prosenttiasteen tasapainotilan saavuttamiseksi tarvittava aika, kun k, on arvioitu ensin yhtälöstä 1 tai 2.

▼B

Tilastollisesti paras kertymävaiheen kesto tilastollisesti hyväksyttävien tulosten saamiseksi (BCF_k) on aika, joka tarvitaan, jotta kalassa olevan testattavan aineen pitoisuuden logaritmia lineaarisen ajan funktiona kuvaava käyrä tulee keskikohtaansa, eli 1,6/k, tai 80 % tasapainotilasta, mutta ei enempää kuin 3,0 k_2/ tai 95 % tasapainotilasta (7).

Aika, joka tarvitaan 80-prosenttisen tasapainotilan saavuttamiseen on (yhtälö 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ tai } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{(yhtälö 5)}$$

Samaten 95 % tasapainotilasta on:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{(yhtälö 6)}$$

Esimerkiksi kertymävaiheen (uptake phase, up) kesto testattavalle aineelle, jonka log P_{ow} = 4, olisi (käyttäen yhtälöitä 1, 5, 6):

$\log_{10}k_2$ = - 0,414.(4) + 1,47 $\qquad$ k_2 = 0,652 vrk^{-1}

up (80 %) = 1,6/0,652; ts. 2,45 vrk (59 tuntia)

tai up (95 %) = 3,0/0,652; ts. 4,60 vrk (110 tuntia).

Samaten testattavalle aineelle, jonka s = 10^{-5} mol/l (log(s) = —5,0), kertymävaiheen kesto olisi (käyttäen yhtälöitä 1, 2, 5, 6):

$\log_{10}$ (P_{ow}) =- 0,862 (- 5,0) + 0,710 = 5,02

$\log_{10}k_2$ = - 0,414 (5,02) + 1,47

k_2 = 0,246 vrk^{-1}

up (80 %) = 1,6/0,246; ts. 6,5 vrk (156 tuntia)

tai up (95 %) = 3,0/0,246; ts. 12,2 vrk (293 tuntia).

Vaihtoehtoisesti yhtälöä

t_{eq} = 6,54 × 10^3 P_{ow} + 55,31 (tuntia)

voidaan käyttää tosiasiallisen tasapainotilan saavuttamiseksi tarvittavan ajan laskemiseen (4).

2. **Poistumavaiheen keston arvioiminen**

Ennakkoarvio ajasta, joka tarvitaan eläimeen kertyneen aineen pitoisuuden jonkin prosenttimäärän poistumiseen, voidaan myös saada kertymä- ja poistumavaihetta (ensimmäisen asteen kinetiikka) kuvaavasta yleisestä yhtälöstä (1) (8).

Oletetaan, että C_w on poistumavaiheessa nolla. Yhtälö saa seuraavan muodon:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \text{ or } C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

jossa $C_{t.o}$ on pitoisuus poistumavaiheen alussa. Siten saavutetaan 50 prosentin poistuma ajankohtana (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ or } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Samaten 95 prosentin poistuma saavutetaan ajankohtana:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Jos 80 %:n kertymää käytetään ensimmäisessä vaiheessa ($1,6/k_2$) ja 95 prosentin poistumaa poistumavaiheessa ($3,0/k_2$), niin poistumavaihe on suunnilleen kaksi kertaa niin pitkä kuin kertymävaihe.

On kuitenkin tärkeää huomata, että nämä arviot perustuvat siihen, että kertymä- ja poistumavaihe noudattavat ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Jos näin ei selvästikään ole, on käytettävä monimutkaisempia malleja (esim. viite (1)).

Kirjallisuusviitteet (liite 3**)**

(1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, pp 309–320.

(2) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

(3) Chiou CT. and Schmedding D.W. (1982), Partitioning of organic compounds in octano!-water Systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp 4–10.

(4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilie compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pp 701—707.

(5) Branson D.R., Blau G.E, Alexander H.C. and Neely \X'.B. (1975), Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), pp 785—792.

(6) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243–255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd N.Y.

(7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, pp 614–622.

Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, pp 3–19.

▼B

LIITE 4

Teoreettinen esimerkki kertymätestin aikataulusta aineille, joiden log P_{ow} = 4

Kalanäytteiden otto	Näytteenottoaikataulu		Vesinäytteiden lukumäärä	Kalojen lukumäärä näytettä kohti
	Vaadittu vähimmäis-taajuus (vrk)	Lisä-näytteet		
Kertymä-vaihe	- 1 0		2 (*) 2	lisättävä 45-80 kalaa
1.	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2.	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3.	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4.	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5.	4,7		2	6
Poistuma-vaihe				Siirto veteen, jossa ei ole testattavaa kemikaalia
6.	5,0	5,3		4 (4)
7	5,9	7,0		4 (4)
8.	9,3	11,2		4 (4)
9.	14,0	17,5		6 (4)

(*) Vedestä otetaan näyte, kun kammioon on lisätty vähintään 3 kammion tilavuutta vettä.

Suluissa olevat luvut ovat mahdollisten lisänäytteiden (vesi, kala) määrä.

Huom.: Ennen testiä tehty arvio k_2:lle, kun log P_{ow} on 4,0 on 0,652 vrk^{-1}. Koko kokeen kesto on 3 X up = 3 x 4,6 vrk eli 14 vrk. Ottovaiheen (up) arviota varten katso liite 3.

▼B

Liite 5

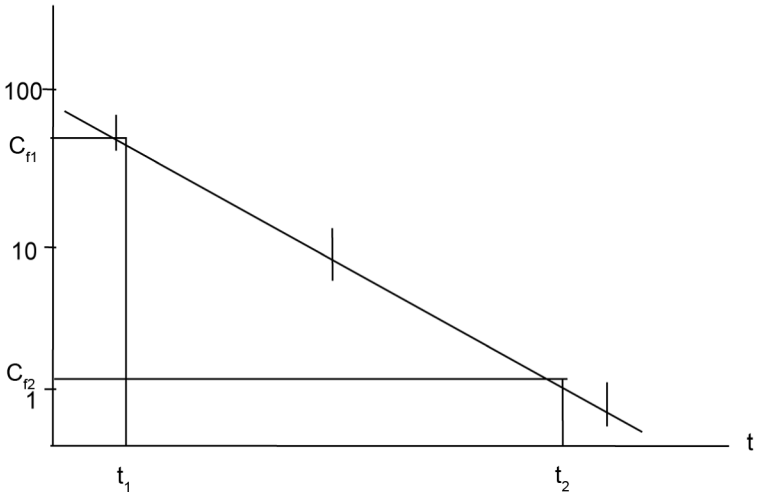
Mallin valitseminen

Biokertymistulosten on yleensä oletettu noudattavan ”kohtuullisesti” yksinkertaista kahden osaston ja kahden muuttujan mallia. Sen osoittaa suora kuvaaja, joka vastaa kalassa poistumavaiheessa havaittuja pitoisuuksia, kun ne esitetään puolilogaritmipaperilla. (Jos näistä pitoisuuksista ei muodostu suoraa kuvaajaa, olisi käytettävä monimutkaisempia malleja, katso esim. Spacie ja Hamelink, liitteen 3 viite 1).

Graafinen menetelmä poistumavakion k_2 määrittämiseksi

Kussakin kalanäytteessä mitattu testattavan aineen pitoisuus esitetään näytteenottoajankohdan funktiona puolilogaritmipaperilla. Tämän kuvaajan kulmakerroin on k_2.

$$k_2 = \frac{\ln (C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



On huomattava, että poikkeamat suorasta viivasta voivat viitata monimutkaisempaan poistumaan kuin ensimmäisen asteen kinetiikkaa noudattavaan poistumaan. Graafista menetelmää voidaan käyttää sellaisten poistumatyyppien selvittämiseen, jotka poikkeavat ensimmäisen asteen kinetiikasta.

Graafinen menetelmä kertymävakion k_1 määrittämiseksi

Kun tunnetaan k_2, lasketaan k_1 seuraavasti:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{(yhtälö 1).}$$

C_f:n arvo luetaan mittaustuloksista saadun tasaisen käyrän keskikohdasta, kun pitoisuuden logaritmi on esitetty ajan funktiona (aritmeettisella asteikolla).

▼B

Kertymä- ja poistumavakioiden laskeminen tietokoneella

Biokertyvyystekijä sekä k_1- ja k_2-nopeusvakiot lasketaan mieluiten tietokoneella käyttäen epälineaarisia parametrien arviointimenetelmiä. Tällaisilla ohjelmilla saadaan arvot k_1:lle ja k_2:lle, jos on sarja peräkkäisiä aikakonsentraatiotuloksia ja malli:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{(yhtälö 2).}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t > t_c \qquad \text{(yhtälö 3).}$$

joissa t_c = aika, jolloin kertymävaihe loppuu.

Tällä menetelmällä saadaan myös k_1:n ja k_2:n keskihajonnan keskivirheet.

Koska k_2 voidaan useimmissa tapauksissa arvioida poistumiskäyrästä suhteellisen suurella tarkkuudella ja koska k_1 ja k_2 korreloivat vahvasti, jos ne arvioidaan samanaikaisesti, voi olla suositeltavaa laskea ensin k_2 poistumavaiheen tuloksista ainoastaan ja laskea sitten k_1 kertymävaiheen tuloksista käyttäen epälineaarisen regression menetelmää.

▼B

C.14. **KALANPOIKASILLA TEHTÄVÄ KASVUTESTI**

1. **MENETELMÄ**

Tämä kasvun mittaukseen perustuva myrkyllisyystesti on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 215 (2000).

1.1 JOHDANTO

Testin tarkoituksena on arvioida vaikutukset, jotka pitkäaikaisella altistuksella kemikaaleille on kalanpoikasten kasvuun. Testi perustuu Euroopan unionissa kehitettyyn ja rengastestattuun (1) (3) menetelmään, jolla arvioidaan kemikaalien vaikutus kirjolohen poikasen *(Oncorynchus mykiss)* kasvuun läpivirtausolosuhteissa. Muitakin hyvin dokumentoituja lajeja voidaan käyttää. Kokemusta on esimerkiksi seeprakalalla *(Danio rerio*) (2) (4) (5) ja medakalla (*Oryzias latipes)* (6) (7) (8) tehdyistä kasvutesteistä.

Ks. myös osan C Yleisjohdanto.

1.2 MÄÄRITELMÄT

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): Pienin testiaineen testattu pitoisuus, jolla aineen havaitaan aiheuttavan merkitsevän vaikutuksen (arvolla $p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Kuitenkin kaikilla LOEC-tasoa suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä haitallinen vaikutus kuin LOEC-tasolla.

NOEC (No Observed Effect Concentration, vaikutukseton pitoisuus): Välittömästi LOEC-tasoa pienempi testipitoisuus.

EC_X: tässä testimenetelmässä se testiaineen pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin muutoksen kalan kasvunopeudessa verrattuna kontrolleihin.

Lastaustiheys: kalojen märkäpaino tilavuusyksikköä kohti.

Varastotiheys: kalojen lukumäärä tilavuusyksikköä kohti.

Yksittäisen kalan spesifinen kasvunopeus: yksittäisen kalan kasvunopeus verrattuna sen alkupainoon.

Tankkikohtainen keskimääräinen spesifinen kasvunopeus: tankin populaation keskimääräinen kasvunopeus yhdessä pitoisuudessa.

Spesifinen pseudokasvunopeus: yksittäisen kalan kasvunopeus verrattuna tankkipopulaation keskimääräiseen alkupainoon.

▼B

1.3 TESTIN PERIAATE

Eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa olevat kalanpoikaset punnitaan ja pannaan testiastioihin, jossa ne altistetaan useille veteen liuotettujen testiaineiden subletaaleille pitoisuuksille mieluiten läpivirtausolosuhteissa, tai jos se ei ole mahdollista, sopivissa puolistaattisissa (staattinen järjestelmä, jossa liuokset vaihdetaan) olosuhteissa. Testin kesto on 28 vuorokautta. Kalat ruokitaan päivittäin. Rehun määrä suhteutetaan kalojen alkupainoon, ja se voidaan laskea uudelleen 14 vuorokauden kuluttua. Testin lopussa kalat punnitaan uudelleen. Vaikutukset kasvunopeuteen analysoidaan käyttämällä regressiomallia sen pitoisuuden estimoimiseksi, joka aiheuttaisi x prosentin vaikutuksen kasvunopeuteen, ts. EC_X(esim. EC_{10},$EC_{,20}$ tai EC_{30}). Vaihtoehtoisesti tuloksia voidaan verrata kontrolliarvoihin pienimmän havaittavan vaikutuksen aiheuttavan pitoisuuden arvioimiseksi ja siitä edelleen sen pitoisuuden arvioimiseksi, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta.

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Välittömän myrkyllisyyden testin (ks. menetelmä C.l), joka on mieluiten tehty tähän testiin valitulla lajilla, tulosten pitäisi olla käytettävissä. Tämä tarkoittaa sitä. että testiaineen vesiliukoisuus ja höyrvnpaine tunnetaan, että käytettävissä on luotettava analyyttinen menetelmä aineen kvantifioimiseksi testiliuoksissa ja että menetelmän tarkkuus ja detektioraja tunnetaan ja ne on raportoitu.

Hyödyllisiä tietoja ovat mm. rakennekaava, aineen puhtaus, stabiilisuus vedessä ja valossa, pK_a, P_{OW}. ja nopean biohajoavuuden testin tulokset (ks. menetelmä C.4).

1.5 TESTIN LUOTETTAVUUS

Testi on luotettava, jos

— kontrollien kuolleisuus ei ole suurempi kuin 10 % testin lopussa,

— kontrollikalojen keskimääräinen paino on noussut niin paljon, että voidaan osoittaa merkitseväksi katsottu kasvunopeuden minimivaihtelu. Rengastestissä (2) on osoitettu, että kirjolohelle kontrollikalojen keskimää räisen painon on noustava 28 vuorokaudessa vähintään puolella (ts. 50 %) verrattuna niiden alkupainoon. Esim: alkupaino: 1 g/kala (= 100 %), loppupaino 28 vuorokauden kuluttua: ≥ 1,5 g/kala (≥ 150 %),

— liuenneen hapen pitoisuus on vähintään 60 % ilman kyllästysarvosta koko testin ajan.

— veden lämpötila vaihtelee enintään 1 °C testiastioiden välillä milloin tahansa testin aikana ja poikkeaa enintään 2 °C siitä lämpötila-alueesta, joka on määritelty kyseiselle testilajille (lisäys 1).

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Laitteet ja tarvikkeet**

Tavallisia laboratoriolaitteita ja erityisesti seuraavat:

— a) happi- ja pH-mittarit:

▼B

— b) laitteet veden kovuuden ja emäksisyyden mittaamiseen;

— c) asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön ja mieluiten sen jatkuvaan seurantaan;

— d) tankkeja, jotka ovat kemiallisesti inerttiä materiaalia ja riittävän suuria suhteessa suositeltuun lastaus- ja varastotiheyteen (ks. kohta 1.8.5 ja lisäys 1);

— e) riittävän tarkka vaaka (ts. ± 0,5 %).

1.6.2 **Vesi**

Testissä voidaan käyttää mitä tahansa sellaista vettä, jossa testilaji elää ja kasvaa sopivan kauan. Veden laadun pitäisi pysyä vakiona testin ajan. Veden pH:n olisi oltava välillä 6,5–8,5, mutta kunkin testin aikana se ei saa vaihdella enempää kuin 0,5 pH-yksikköä. Suositeltava veden kovuus on yli 140 mg/l ($CaCO_3$). Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa ainetta), näytteitä olisi otettava säännöllisin väliajoin määrityksiä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca, Mg, Na. K, C1, SO_4), torjunta-aineet (esim. orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet olisi määritettävä esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrityksiä voidaan tehdä harvemmin (esim. kuuden kuukauden välein). Lisäyksessä 2 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden ominaisuuksia.

1.6.3 **Testiliuokset**

Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla.

Varastoliuos valmistetaan mieluiten yksinkertaisesti sekoittamalla testattava aine laimennusveteen käyttäen mekaanisia menetelmiä tai ultraääntä. Saturaatiopylväitä (liukoisuuspylväitä) voidaan käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi.

Liuottimien tai liuotusapuaineiden (dispergointiaineiden) käyttö voi olla tarpeen joissakin tapauksissa riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Sopivia liuottimia ovat esimerkiksi asetoni, etanoli, metanoli, dimetyylisulfoksidi, dimenyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sopivia dispergointiaineita ovat esimerkiksi Cremophor RH40, Tween 80, 0,01-prosenttincn metyyliselluloosa ja HCO-40. Helposti biohajoavia aineita (kuten asetonia) ja/tai helposti haihtuvia aineita käytettäessä on oltava varovainen, koska ne voivat aiheuttaa ongelmia bakteerikasvuston takia läpivirtaustesteissä. Jos käytetään liuotusapuaineita, niillä ei saa olla merkittävää vaikutusta kalojen kasvuun eikä näkyviä haitallisia vaikutuksia kalanpoikasiin. Se on osoitettava ainoastaan liuotinta sisältävän kontrollin avulla.

▼B

Läpivirtaustesteissä on käytettävä testiaineen varastoliuosta jatkuvasti annostelevaa ja laimentavaa järjestelmää (esim. annostelupumppua, laimenninta, kyllästävää järjestelmää) eri pitoisuuksia sisältävien näytteiden annostelemiseksi testiastioihin. Varastoliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saisi vaihdella enintään 10 % koko testin aikana. Rengastestissä (3) on osoitettu, että hyväksyttävä vedenvaihtotaajuus on kirjolohelle 6 litraa grammaa kalaa kohti päivässä (ks. kohta 1.8.2.2).

Puolistaattisissa (joissa liuokset vaihdetaan) testeissä kasvatusnesteen vaihtoväli riippuu testiaineen stabiilisuudesta, mutta vaihtoa suositellaan kerran päivässä, jos alustavista stabiilisuustesteistä (ks. kohta 1.4) tiedetään, ettei testiaineen pitoisuus pysy vakiona (ts. se ei ole välillä 80–120 % nimellisarvosta tai se laskee alle 80 prosenttiin mitatusta alkupitoisuudesta) vaihtojen välillä, olisi harkittava läpivirtaustestiä.

1.6.4 **Kalalajin valinta**

Kirjolohi *(Oncorhynchus mykiss*) on suositeltava laji tähän testiin, koska rengastestissä on eniten kokemusta siitä (1) (3). Muutakin hyvin dokumentoitua lajia saa käyttää, mutta testimenetelmää on mahdollisesti mukautettava, jotta testiolosuhteet olisivat sopivat. Kokemusta on esim. seeprakalasta *(Danio rerio)* (4) (5) ja medakasta *(Oryzias latipes)* (6) (7) (8). Tällaisessa tapauksessa olisi selostettava syyt lajin ja koemenetelmän valitsemiseen.

1.6.5 **Kalojen hoito**

Testikalat on valittava yhdestä populaatiosta, mieluiten samasta poikueesta, jota on pidetty vähintään kaksi viikkoa ennen testiä samanlaatuisessa vedessä ja samanlaisissa valaistusolosuhteissa kuin ne, joita käytetään testissä. Kaloille olisi annettava ravintoa vähintään 2 % ja mieluiten 4 % elopainoa kohti päivässä niiden kasvatusaikana ja testin aikana.

Kalojen kuolleisuus rekisteröidään 48 tunnin sopeutumisajanjakson jälkeen. Tämän jälkeen sovelletaan seuraavia perusteita:

— jos kuolleisuus on yli 10 % populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa: koko erä hylätään,

— jos kuolleisuus on välillä 5-10 % populaatiosta: kaloja totutetaan vielä seitsemän päivää. Jos kuolleisuus on yli 5 % näiden toisten seitsemän päivän aikana, koko erä hylätään,

— jos kuolleisuus on alle 5 % populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa: erä hyväksytään.

Kaloille ei saisi antaa mitään hoitoa sairautta varten testiä edeltävien kahden viikon aikana eikä testin aikana.

▼B

1.7 TESTIN SUUNNITTELU

”Testin suunnittelu” tarkoittaa testipitoisuuksien lukumäärän ja pitoisuusvälien valintaa, tankkien lukumäärää kutakin pitoisuutta kohti ja kalojen lukumäärää tankkia kohti. Testi pitäisi suunnitella mieluiten niin, että otetaan huomioon

— a) tutkimuksen tarkoitus;

— b) käytettävä tilastollisen analyysin menetelmä;

— c) kokeessa tarvittavien resurssien saatavuus ja kustannukset.

Tavoitteita ilmoitettaessa olisi mahdollisuuksien mukaan spesifioitava, millä tilastollisella teholla tietynsuuruinen ero (esim. kasvunopeudessa) on osoitettava tai vaihtoehtoisesti millä tarkkuudella EC_X (esim. kun x = 10, 20 tai 30, ja mieluiten vähintään 10) on estimoitava. Muuten tutkimuksen kokoa ei voida määritellä tarkasti.

On tärkeää huomata, että suunnitelma, joka on optimaalinen (hyödyntää resurssit parhaiten) yhdelle tilastoanalyysimenetelmälle, ei ole välttämättä optimaalinen toiselle menetelmälle. LOEC/NOEC-arvon estimoinnille suositeltava suunnitelma ei siis olisi sama kuin regressioanalyysiä varten suositeltava.

Useimmissa tapauksissa regressioanalyysi on parempi kuin varianssianalyysi. Syitä ovat käsitelleet Stephan ja Rogers (9). Jos kuitenkaan ei löydetä sopivaa regressiomallia ($r^2 < 0,9$), olisi käytettävä NOEC|LOEC-menetelmää.

1.7.1 **Regressioanalyysille suositeltava testisuunnitelma**

Regressioanalyysillä käsiteltävän testin suunnitelmassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— a) Testissä käytettävien pitoisuuksien on katettava vaikutuspitoisuus (esim. $EC_{10, 20, 30}$) ja se pitoisuusalue, joka on merkityksellinen kyseisen testiaineen kannalta. Tarkkuus, jolla vaikutuspitoisuuksien estimaatit voidaan tehdä, on paras, kun vaikutuspitoisuus sijoittuu testattujen pitoisuuksien keskialueelle. Alustava pitoisuusalueen määrittely voi auttaa sopivien testipitoisuuksien valinnassa.

— b) Jotta tilastollinen mallitus olisi mahdollista, testissä pitäisi olla vähintään yksi kontrollitankki ja viisi muuta tankkia, joissa on eri pitoisuudet. Jos käytetään liuotusapuaineita, on testisarjan lisäksi määritettävä yksi kontrolli, joka sisältää liuotusapuainetta suurimmassa testipitoisuudessa (ks. kohdat 1.8.3 ja 1.8.4),

— c) Sopivaa geometrista tai logaritmista sarjaa (10) (ks. lisäys 3) voidaan käyttää. On suositeltavaa tehdä pitoi suuksista logaritminen sarja.

▼B

— d) Jos käytettävissä on enemmän kuin kuusi tankkia, lisätankit olisi käytettävä joko rinnakkaismäärityksiin tai niissä olevat pitoisuudet olisi sijoitettava koko pitoisuusalueen yli, jotta pitoisuuksien eroja voidaan pie nentää. Kumpikin tapa on yhtä hyvä.

1.7.2 **Varianssianalyysillä (ANOVA) käsiteltävälle NOEC/LOEC-menetelmälle suositeltava testisuunnitelma**

Kullekin pitoisuudelle pitäisi olla mieluiten rinnakkaiset tankit, ja tilastollinen analyysi pitäisi tehdä tankkien tasolla (11). Ilman rinnakkaisia tankkeja ei voida tehdä korjauksia tankkien välisen vaihtelun ottamiseksi huomioon sen vaihtelun lisäksi, joka johtuu yksittäisistä kaloista. Kokemus on kuitenkin osoittanut (12), että tankkien välinen vaihtelu on erittäin pieni verrattuna tankin sisäiseen (ts. kalojen väliseen) vaihteluun. Suhteellisen hyväksyttävä vaihtoehto on siksi tehdä tilastollinen analyysi yksittäisten kalojen tasolla.

Tavanomaisesti käytetään vähintään viittä testipitoisuutta geometrisessa sarjassa, jolloin kerroin ei mielellään saa ylittää arvoa 3,2.

Yleensä kun testeissä on rinnakkaisia tankkeja, rinnakkaisten kontrollitankkien lukumäärän ja siten kalojen määrän pitäisi olla kaksi kertaa niiden määrä kussakin testipitoisuudessa, joiden pitäisi olla samansuuruiset (13) (14) (15). Jos sen sijaan ei käytetä rinnakkaisia tankkeja, kontrolliryhmän kalojen lukumäärän olisi oltava sama kuin niiden lukumäärä kussakin testipitoisuudessa.

Jos ANOVA-analyysin on määrä perustua tankkeihin eikä yksittäisiin kaloihin (mikä edellyttäisi joko kalojen yksilöllistä merkitsemistä tai spesifisen pseudokasvunopeuden käyttöä (ks. kohta 2.1.2)), on rinnakkaisia tankkeja oltava niin paljon, että kutakin pitoisuutta varten käytettävien tankkien välinen keskihajonta voidaan määrittää. Tämä tarkoittaa sitä. etta virhettä koskevien vapausasteiden määrän varianssianalyysissä on oltava vähintään 5 (11). Jos vain kontrolleista on rinnakkaiset, on vaara, että virheen vaihtelu vääristyy, koska se voi kasvaa kyseessä olevan kasvunopeuden keskiarvon mukana. Koska kasvunopeus todennäköisesti pienenee pitoisuuden noustessa, tämä saattaa johtaa vaihtelun estimointiin liian suureksi.

1.8. MENETTELY

1.8.1 **Kalojen valinta ja punnitus**

On tärkeää minimoida kalojen painon vaihtelu testin alussa. Lisäyksessä 1 mainitaan, minkälainen kokovaih-telu sopii tähän testiin suositelluille eri lajeille. Testissä käytettävässä koko kalaerässä yksittäisten kalojen painot eivät saisi vaihdella testin alussa mielellään enempää kuin ±10 % aritmeettisesta keskiarvosta eikä missään tapauksessa enemmän kuin 25 %. Suositellaan, että punnitaan alustava erä kaloja keskimääräisen painon arvioimiseksi.

▼B

Kantapopulaatiota ei saisi ruokkia 24 tuntiin ennen testin alkua. Kalat valitaan sitten satunnaistetusti. Kalat anestetisoidaan yleisellä anestesia-aineella (esim. vesiliuos, jossa on 100 mg/l trikaiinimetaanisulfonaattia (MS 222), joka on neutralisoitu lisäämällä kaksi osaa natriumbikarbonaattia yhtä osaa MS 222:ta kohti) ja punnitaan yksittäin (märkäpaino; pyyhekuivattuna) Lisäyksessä 1 mainitulla tarkkuudella. Kalat, joiden paino on annetuissa rajoissa, otetaan testiin ja jaetaan satunnaistetusti testiastioihin. Kalojen kokonaismärkäpaino kussakin testiastiassa kirjataan. Anestesia samoin kuin kalojen käsittely (kuten kuivaaminen ja punnitus) voi aiheuttaa kalanpoikasille, erityisesti pienikokoisille kaloille, stressiä ja vaurioita. Kalanpoikasia on siksi käsiteltävä äärimmäisen varoen stressin ja vahingoittumisen välttämiseksi.

Kalat punnitaan uudelleen päivänä 28 (ks. kohta 1.8.6), Jos katsotaan, että ruoka-annos on laskettava uudelleen, kalat voidaan punnita uudelleen päivänä 14 (ks. kohta 1.8.2.3). Muitakin menetelmiä, kuten valokuvaamista, voidaan käyttää kalojen koon muutosten määrittämiseksi. Rehun määrä voidaan siten mukauttaa koon muutoksiin.

1.8.2 **Altistusolosuhteet**

1.8.2.1 *Testin kesto*

Testin kesto on ≥ 28 vuorokautta.

1.8.2.2 *Lastaus- ja varastotiheys*

On tärkeää, että lastaus- ja varastotiheys ovat käytetylle kalalajille sopivia (ks. lisäys 1). Jos varastotiheys on liian suuri, ahtaus aiheuttaa stressiä, jonka seurauksena kasvunopeus laskee ja kalat voivat sairastua. Jos varas-totiheys on liian pieni, voi aiheutua territoriaalikäyttäytymistä, joka voi myös vaikuttaa kasvuun. Joka tapauksessa lastaustiheyden pitäisi olla niin pieni, että liuenneen hapen pitoisuus voidaan pitää vähintään arvossa 60 % ilman ilmastusta. Rengastestissä (3) on osoitettu, että hyväksyttävä lastaustiheys kirjolohelle on 16 kirjolohta (paino 3–5 g) 40 litrassa. Suositeltava veden vaihtamistaajuus testin aikana on 6 litraa grammaa kohti kalaa vuorokaudessa.

1.8.2.3 *Ruokkiminen*

Kaloille pitäisi antaa sopivaa ravintoa (lisäys 1) riittävästi, jotta kasvunopeus on hyväksyttävä. On varottava, ettei vedessä kasva mikrobeja eikä se samennu. Kirjolohelle mainitut edellytykset todennäköisesti täyttävä ruokintatiheys on 4 % elopainosta vuorokaudessa (3) (16) (17) (18). Päiväannos voidaan jakaa kahteen yhtä suureen osaan ja antaa kahtena kertana päivässä. Ruokintojen välin on oltava vähintään 5 tuntia. Annoksen määrä perustuu kalojen kokonaispainoon kutakin testiastiaa kohti testin alussa. Jos kalat punnitaan uudelleen päivänä 14, annos lasketaan uudelleen. Kaloja ei saa ruokkia 24 tuntiin ennen punnitusta.

▼B

Syömättä jäänyt rehu ja ulosteet on poistettava testiastioista päivittäin puhdistamalla tankkien pohjat huolellisesti imulaitteella.

1.8.2.4 *Valo ja lämpötila*

Valoisan ajan ja testiveden lämpötilan pitäisi olla sopivia käytetylle testilajille (lisäys 1).

1.8.3 **Testipitoisuudet**

Yleensä tarvitaan viisi testipitoisuutta riippumatta testisuunnitelmasta (ks. kohta 1.7.2). Jos testiaineen myrkyllisyydestä on aiempia tietoja (esim. akuutista testistä ja/tai alustavista pitoisuusalueen määrityksistä), ne auttavat sopivien testipitoisuuksien valinnassa. Jos käytetään vähempää kuin viittä testipitoisuutta, se on perusteltava. Suurin testipitoisuus ei saisi olla suurempi kuin aineen liukoisuus veteen.

Kun varastoliuosten valmistuksessa käytetään jotakin liuotusapuainetta, sen lopputilavuus testiastioissa ei saisi olla suurempi kuin 0,1 ml/l, ja tilavuuden pitäisi olla sama kaikissa testiastioissa (ks. kohta 1.6.3). Näiden aineiden käyttöä on kuitenkin vältettävä mahdollisimman pitkälle.

1.8.4 **Kontrollit**

Laimennusvesikontrollien lukumäärä riippuu testisuunnitelmasta (ks. kohdat 1.7–1.7.2). Jos käytetään liuotusapuainetta, testiin on otettava mukaan yhtä monta liuotusapuainekontrollia kuin laimennusvesikontrolleja.

1.8.5 **Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus**

Testiaineen pitoisuudet on määritettävä säännöllisin määräajoin testin aikana (ks. jäljempänä).

Läpivirtaustesteissä laimennusveden ja myrkyllistä ainetta sisältävän varastoliuoksen virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saisi vaihdella enintään 10 prosenttia koko testin aikana. Jos testiainepitoisuuksien odotetaan pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta (ts. välillä 80–120 %, ks. kohdat 1.6.2 ja 1.6.3), suositellaan, että määritetään vähintään suurimmat ja pienimmät pitoisuudet testin alussa ja viikon välein sen jälkeen, jos testiaineen pitoisuuden ei odoteta pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta (aineen stabiilisuutta koskevien tietojen perusteella), on analysoitava kaikki pitoisuudet noudattaen samanlaista järjestelmää.

Puolistaattisissa (jossa liuokset vaihdetaan) testeissä suositellaan, että määritetään vähintään suurimmat ja pienimmät pitoisuudet tuoreesta liuoksesta ja juuri ennen liuoksen vaihtoa testin alussa ja viikon välein sen jälkeen, jos testiainepitoisuuksien odotetaan pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta. Jos testiaineen pitoisuuden ei odoteta pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta, on analysoitava kaikki pitoisuudet noudattaen samanlaista järjestelmää kuin stabiilimmille aineille.

▼B

Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos kuitenkin on näyttöä siitä, että testiaineen pitoisuus pysyy tyydyttävästi 20 prosentin sisällä nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia.

Näytteet voivat edellyttää sentrifugointia tai suodatusta (esim. 0,45 um:n huokoskoon suotimella). Sentrifugointia suositellaan. Jos testiaine ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää.

Liuennut happi, pH ja lämpötila on mitattava testin aikana kaikista testiastioista. Veden kokonaiskovuus, emäksisyys ja suolapitoisuus (jos sillä on merkitystä) mitataan kontrolleista ja yhdestä astiasta, jossa on suurin pitoisuus. Vähintään olisi mitattava liuennut happi ja suolapitoisuus (jos sillä on merkitystä) kolmesti (testin alussa, keskivaiheilla ja lopussa). Suositellaan, että puolistaattisissa testeissä liuennut happi mitataan useammin, mieluiten ennen kutakin veden vaihtoa ja sen jälkeen tai vähintään kerran viikossa. pH olisi mitattava kunkin vedenvaihdon alussa ja lopussa puolistaattisissa testeissä ja vähintään viikoittain läpivirtaustesteissä. Kovuus ja emäksisyys olisi mitattava kerran testin aikana. Lämpötilaa olisi mielellään seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä testiastiassa.

1.8.6 **Havainnot**

Paino: Testin lopussa on määritettävä kaikkien elossa olevien kalojen märkäpaino (pyyhekuivattuna) joko ryhmittäin testiastiaa kohti tai yksittäin. Punnitseminen testiastiaa kohti on parempi kuin yksittäisten kalojen punnitseminen, jolloin kalat olisi merkittävä yksilöllisesti. Jos mitataan kunkin kalan paino yksilöspesifisen kasvunopeuden määrittämiseksi, olisi valittava sellainen merkintätapa, joka ei stressaisi eläimiä (kylmämerkinnän vaihtoehdot, esim. hienon värillisen siiman käyttö, voivat olla sopivia).

Kaloja on havainnoitava päivittäin testin aikana, ja kaikki ulkoiset poikkeavuudet (kuten verenvuoto, värin muutokset) olisi pantava merkille. Mahdolliset kuolemantapaukset on kirjattava ja kuolleet kalat poistettava mahdollisimman nopeasti tankista. Kuolleiden kalojen tilalle ei panna uusia, sillä lastaus- ja varastotiheys ovat niin suuret, että kunkin tankin kalojen määrän muutokset eivät vaikuta kasvuun. Ruokkimistaajuutta on kuitenkin mukautettava.

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Suositellaan, että sekä testin suunnittelussa että analysoinnissa on mukana tilastotieteilijä, koska menetelmä mahdollistaa huomattavaa joustoa kokeen suunnittelussa. Esim. testiastioiden lukumäärä, testipitoisuuksien lukumäärä ja kalojen lukumäärä voivat olla erilaiset.

▼B

Kasvunopeuksia ei lasketa sellaisille testiastioille, joissa kuolleisuus on yli 10 %. Kuolleisuus olisi kuitenkin ilmoitettava kaikille testipitoisuuksille.

Riippumatta tulosten analysointiin käytettävästä menetelmästä keskeinen käsite on spesifinen kasvunopeus r ajankohtien t_1, ja t_2 välillä. Se voidaan määritellä useilla tavoilla riippuen siitä, onko kalat merkitty yksilöllisesti vai ei ja siitä, tarvitaanko tankin keskiarvoa.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

jossa

r_1 = yksittäisen kalan spesifinen kasvunopeus

r_2 = tankkikohtainen keskimääräinen kasvunopeus

r_3 = spesifinen pseudokasvunopeus

W_1, W_2 = tietyn kalan paino ajankohdalla t_1, ja t_2

$\log_e W_1$ = yksittäisen kalan painon logaritmi testin alussa

$\log_e$, W_2 = yksittäisen kalan painon logaritmi testin lopussa

$\log_e W_1$ = w_1-arvojen logaritmien keskiarvo tankin kaloille testin alussa

$\log_e W_2$ = w_2-arvojen logaritmien keskiarvo tankin kaloille testin alussa

t_1,t_2 = aika (päiviä) testin alussa ja lopussa

r_1, r_2, r_3 voidaan laskea ajalle 0–28 vuorokautta ja tarvittaessa (ts. kun päivänä 14 on tehty mittaus) ajalle 0–14 vuorokautta ja 14–28 vuorokautta.

2.1.1 **Tulosten regressioanalyysi (pitoisuus-vastemallitus)**

Tässä analyysimenetelmässä sovitetaan sopiva matemaattinen vastaavuussuhde spesifisen kasvunopeuden ja pitoisuuden välille, ja sen avulla voidaan estimoida EC_x ts. mikä tahansa LC-arvo. Tämä menetelmä ei edellytä r-arvon laskemista yksittäisille kaloille (r_1); sen sijaan analyysi perustuu tankkia kohti määritettyyn keskiarvoon (r_2). Jälkimmäinen menetelmä on suositeltava. Se on parempi myös pienikokoisille kalalajeille.

Tankkikohtainen keskimääräinen spesifinen kasvunopeus (r_2) esitetään kuvaajassa pitoisuuden funktiona, jotta voidaan tarkastella pitoisuus-vastesuhdetta.

▼B

Jotta r_2-arvon ja pitoisuuden välinen suhde voidaan ilmaista, on valittava sopiva malli, ja valinnan tueksi on esitettävä asianmukaiset perustelut.

Jos elossa olevien kalojen määrä tankeissa on erilainen, on mallin sovitus — olipa se yksinkertainen tai epälineaarinen — painotettava siten, että siinä otetaan huomioon ryhmien epätasainen koko.

Mallin sovitusmenetelmän on oltava sellainen, että voidaan estimoida esim. EC_{20} ja laskea sen hajonta (joko keskivirhe tai luottamusväli). Sovitetun mallin kuvaaja on esitettävä mittaustulosten kanssa, jotta mallin sopivuus voidaan nähdä (8) (18) (19) (20).

2.1.2 **Tulosten analysointi LOEC-arvon estimoimiseksi**

Jos testissä on rinnakkaiset tankit kaikilla pitoisuuksilla, LOEC-arvon estimointi voi perustua tankkikohtaisen keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden varianssianalyysiin (ANOVA) (ks. kohta 2.1), jonka jälkeen sopivalla menetelmällä (esim. Dunnettin tai Williamsin testillä (12) (13) (14) (21) verrataan kullakin pitoisuudella saatua r-arvoa kontrollien keskimääräiseen r-arvoon, jotta voidaan tunnistaa pienin pitoisuus, jolla kyseinen ero on merkitsevä todennäköisyystasolla 0,05. Jos parametristen menetelmien edellyttämät vaatimukset eivät täyty –epänormaali jakauma (esim. Shapiro-Wilkin testi) tai heterogeeninen varianssi (Bartlettin testi) — olisi harkittava mittaustulosten muuntamista varianssien homogenisoimiseksi ennen ANOVA-analyysiä tai painotetun ANOVAn tekemistä.

Jos testissä ei ole rinnakkaisia tankkeja kaikilla pitoisuuksilla, tankkeihin perustuva ANOVA on epäherkkä tai mahdoton suorittaa. Tällaisessa tilanteessa on hyväksyttävää perustaa ANOVA yksittäisten kalojen spesifiseen pseudokasvunopeuteen r_3.

Kunkin testipitoisuuden keskimääräistä r_3-arvoa voidaan sitten verrata kontrollien keskimääräiseen r_3-arvoon. LOEC-arvo voidaan sitten määrittää kuten edellä. On todettava, että tässä menetelmässä ei voida ottaa lainkaan huomioon suurempaa tankkien välistä vaihtelua kuin minkä yksittäisten kalojen välinen vaihtelu selittää. Kokemus on kuitenkin osoittanut (9), että tankkien välinen vaihtelu on erittäin pieni verrattuna tankinsisäiseen (ts. kalojen väliseen) vaihteluun. Jos analyysi ei ota huomioon yksittäisiä kaloja, on selostettava suuresti poikkeavien näytteiden tunnistamiseen käytetty menetelmä ja perusteltava se.

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Tulosten tulkinnassa on oltava varovainen, jos testiliuosten myrkyllisen aineen pitoisuudet ovat lähellä määritysmenetelmän havaitsemisrajaa tai jos puolistaattisessa testissä testiaineen pitoisuus ennen liuoksen vaihtoa on pienempi kuin juuri valmistetussa liuoksessa.

2.3 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

▼B

2.3.1 **Testiaine**

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä,

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan luettuna puhtausaste, ja testiaineen kvantifiointiin käytettävä analyyttinen menetelmä (tarvittaessa).

2.3.2 **Testissä käytettävät kalalajit**

— mahdollisesti tieteellinen nimi,

— kanta, koko, toimittaja, mahdolliset esikäsittelyt jne.

2.3.3 **Koeolosuhteet:**

— käytetty testimenetelmätyyppi (esim. puolistaattinen tai läpivirtausmenetelmä, lastaustiheys, varastotiheys),

— testin suunnittelu (esim. testiastioiden, testipitoisuuksien ja rinnakkaisten näytteiden lukumäärä, kalojen lukumäärä astiaa kohti),

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtojen väli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitet tava, jos sellaista käytetään),

— nimelliset testipitoisuudet, mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat testiastioissa, niiden laske miseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset on tehty todella liuoksessa olevasta testi aineesta,

— laimennukseen käytetyn veden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuus (jos se on mitattu), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä, suspensiossa olevat kiinteät aineet, testiväliaineen suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja muut mahdolliset mittaukset,

— testiastioissa olevan veden laatu: pH, kovuus, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus,

— yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. rehu(je)n tyyppi, alkuperä, annettu määrä ja antotaajuus).

2.3.4 **Tulokset:**

— näyttö siitä, että kontrollit täyttivät eloonjäämistä koskevan validiteettivaatimuksen, ja missä tahansa pitoi suudessa esiintynyttä kuolleisuutta koskevat tarkat tiedot,

— käytetyt analyyttiset tilastomenetelmät, rinnakkaisnäyte- tai kalaperusteiset tilastot, mittaustulosten käsittely ja käytettyjen tekniikoiden perustelut,

— taulukoidut mittaustulokset yksittäisten kalojen painoista ja keskimääräisistä painoista päivinä 0, 14 {jos on mitattu) ja 28, tankkikohtaiset keskimääräiset kasvunopeudet tai spesifiset pseudokasvunopeudet ajan jaksoille 0–28 vuorokautta tai mahdollisesti ajanjaksoille 0–14 ja 14–28 vuorokautta,

— tilastollisen analyysin (ts. regressioanalyysin tai ANOVAn) tulokset mieluiten taulukko- ja kuvaajamuodossa sekä LOEC-arvo ($p = 0,05$) ja NOEC-arvo tai EC_x-arvo sekä keskivirheet, jos mahdollista,

▼B

— kalojen mahdolliset epätavalliset reaktiot ja testiaineen aiheuttamat mahdolliset näkyvät vaikutukset.

3. LÄHDELUETTELO

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

(2) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(3) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp. 1855–1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)*: rcsults of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp. 157–164.

(5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G. VV., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (199 5). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol.28, pp. 287–297.

(7) Benoit, D. A., Holcombe, G. VV. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth. Minnesota.

(8) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328-338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS l/RM/28, 81 pp.

(10) Cox D. R. (1958). Planning of experiments, Wiley Edt.

(11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

▼B

(14) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(15) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 123-133.

(16) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.* Journal of Fish Biology, 37, pp. 33-41.

(17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

(18) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485-1494.

(19) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(20) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510-531.

▼B

Lisäys 1

TESTIIN SUOSITELLUT KALALAJIT JA SOPIVAT TESTIOLOSUHTEET

Laji	Suositeltu lämpötila-alue (°C)	Valojaksot (tuntia)	Suositellut kalojen painorajat testin alussa (g)	Vaadittu mittaustarkkuus	Lastaustiheys (g/l)	Varastotiheys (litraa kohti)	Rehu	Testin kesto (vrk)
Suositellut kalalajit:								
Oncorhynchus mykiss Kirjolohi	12,5–16,0	12–16	1–5	100 mg	1,2–2,0	4	Kaupallinen lohikalojen poikasten kuivarehu	≥ 28
Muita hyvin dokumentoituja lajeja:								
Danio rerio Seeprakala	21–25	12–16	0,050–0,100	1 mg	0,2–1,0	5–10	Elävää ravintoa *(Brachionus Artemia)*	≥ 28
Oryzias latipes Medaka	21–25	12–16	0,050–0,100	1 mg	0,2–1,0	5–20	Elävää ravintoa *(Brachionus Artemia)*	≥ 28

▼B

Lisäys 2

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Aine	Pitoisuus
Kiinteät aineet	< 20 mg/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ammoniakki (ionisoitumaton)	< 1 µg/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä ja polyklooratut bifebyylit	< 50 ng/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

▼B

Lisäys 3

Myrkyllisyystestiin soveltuvien pitoisuuksien logaritmiset sarjat (9)

Sarake välillä 100-10 tai välillä 10-1 olevien pitoisuuksien lukumäärä)(*)

1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Sarakkeesta voi valita viiden (tai useamman) peräkkäisen pitoisuuden sarjan. Sarakkeessa (x) olevien pitoisuuksien keskivälillä olevia arvoja on sarakkeessa (2x + 1). Luetellut arvot voivat olla prosenttiosuuksina tilavuusyksikköä tai painoyksikköä kohti ilmaistuja pitoisuuksia (mg/l tai µg/l). Arvot voidaan tarvittaessa jakaa tai kertoa kymmenen potensseilla. Saraketta 1 voidaan käyttää, jos myrkyllisyystaso on hyvin epävarma

▼B

C.15 KALAN ALKIO- JA RUSKUAISPUSSIVAIHEEN POIKASILLA TEHTÄVÄ LYHYTAIKAINEN MYRKYLLISYYSTESTI

1. MENETELMÄ

Tämä lyhytaikainen myrkyllisyystesti on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 212 (1998).

1.1 JOHDANTO

Tämä lyhytaikainen kalan alkio- ja ruskuaispussivaiheen poikasilla tehtävä myrkyllisyystesti on lyhytaikainen testi, jossa altistetaan testiaineelle varhaisessa kehitysvaiheessa olevia kalan alkioita juuri hedelmöityneistä munista ruskuaispussivaiheen loppuun asti. Alkio- ja ruskuaispussivaihetestissä ci anneta ravintoa, joten testi pitäisi lopettaa vaiheessa, jossa ruskuaispussivaihealkio saa vielä ravintonsa ruskuaispussista.

Testissä on tarkoitus määrittää kemikaalien letaalit ja rajoitetussa määrin subletaalit vaikutukset tietyn lajin tietyissä kehitysvaiheissa oleviin poikasiin. Tästä testistä saatavat tiedot olisivat hyödyllisiä, koska a) testin avulla voitaisiin muodostaa yhteys letaalien ja subletaalien vaikutusten välille, b) sitä voitaisiin käyttää joko täydellisen varhaiskehitysvaiheiden testin tai pitkäaikaisten myrkyllisyystestien seulontatestinä ja c) sillä voitaisiin testata lajeja, joiden kasvatusmenetelmät eivät ole vielä niin kehittyneet, että hallittaisiin vaihe, jolloin eläin siirtyy endogeenisestä ravinnonotosta eksogeeniseen ravinnonottoon.

Olisi muistettava, että kemikaalien pitkäaikainen myrkyllisyys kaloille voidaan yleensä arvioida tarkasti vain testeillä, jotka kattavat kaikki kalan elinkierron vaiheet. Jos altistetaan vain tietyissä kehitysvaiheissa olevia kaloja, testin herkkyys kärsii, ja pitkäaikainen myrkyllisyys voidaan aliarvioida. Sen vuoksi on odotettavissa, että alkio- ja ruskuaispussivaihetesti on vähemmän herkkä kuin täydellinen varhaiskehitysvaiheiden testi, erityisesti kun kysymyksessä ovat erittäin lipofiiliset (log P_{ow} > 4) kemikaalit ja sellaiset kemikaalit, joiden myrkyllisyysvaikutus on spesifinen. Kuitenkin voidaan odottaa, että kyseisten kahden testin väliset herkkyyserot ovat pienempiä kemikaaleilla, joilla on epäspesifinen narkoottinen vaikutus (1).

Ennen tämän testin julkaisemista useimmat tiedot alkio- ja ruskuaispussivaiheen kaloilla on saatu makeassa vedessä elävällä *Danio rerio* Hamilton-Buchanan -kalalla (Teleostei, Cyprinidae; yleinen nimi seeprakala). Tällä kalalla suoritettavasta testistä annetaan siksi yksityiskohtaisemmat ohjeet lisäyksessä 1. Muitakin lajeja, joista on kokemusta, voidaan kuitenkin käyttää (Taulukot 1 A ja 1 B).

1.2 MÄÄRITELMÄT

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): Pienin testiaineen testattu pitoisuus, jolla aineen havaitaan aiheuttavan merkitsevän vaikutuksen (arvolla $p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Kuitenkin kaikilla LOEC-tasoa suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä haitallinen vaikutus kuin LOEC-tasolla.

NOEC (No Observed Effect Concentration): Välittömästi LOEC-tasoa pienempi testipitoisuus.

▼B

1.3 TESTIN PERIAATE

Alkio- ja ruskuaispussivaiheessa olevia kaloja altistetaan veteen liuotetun testiaineen eri pitoisuuksille. Testi voidaan tehdä testiaineesta riippuen joko puolistaattisena tai läpivirtaustestinä. Testin alussa hedelmöityneet munat pannaan testiastioihin, ja testi lopetetaan juuri ennen kuin mahdollisten toukkien ruskuaispussi on imeytynyt täydellisesti yhdessäkään testiastiassa tai ennen kuin kontrolleissa havaitaan ravinnonpuutteesta johtuvia kuolemantapauksia. Letaalit ja subletaalit vaikutukset arvioidaan ja niitä verrataan kontrolliarvoihin pienimmän havaittavan vaikutuksen aiheuttavan pitoisuuden arvioimiseksi ja siitä edelleen sen pitoisuuden arvioimiseksi, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta. Vaihtoehtoisesti vaikutukset voidaan arvioida käyttämällä regressiomallia sen pitoisuuden estimoimiseksi, joka aiheuttaisi tietyn prosentuaalisen vaikutuksen (ts. LC/EC_X, jossa x on määritelty prosenttiarvo).

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Välittömän myrkyllisyyden testin (ks. menetelmä C.1) tulosten pitäisi olla käytettävissä. Mieluiten samalla lajilla tehdyn testin tuloksista voi olla hyötyä valittaessa sopivaa pitoisuusaluetta varhaisten kehitysvaiheiden testiin. Testiaineen vesiliukoisuuden (myös liukoisuuden testissä käytettävään veteen) ja höyrynpaineen pitäisi olla tiedossa. Käytettävissä pitäisi olla myös tarkkuudeltaan ja määritysrajaltaan tunnettu sopiva analyyttinen menetelmä aineen määrittämiseksi kvantitatiivisesti testiliuoksissa.

Testiainetta koskevia tietoja, joista on hyötyä testiolosuhteiden määrittelemiseksi, ovat mm. rakennekaava, aineen puhtaus, valostabiilisuus, stabiilisuus testiolosuhteissa, pKa, P_{ow} ja helpon biohajoavuuden testin tulokset (ks. menetelmä C.4).

1.5 TESTIN LUOTETTAVUUS

Testi on luotettava, jos

— hedelmöityneiden munien eloonjäämisaste kontrolleissa ja tapauksen mukaan ainoastaan liuotinta sisältävissä astioissa on vähintään yhtä suuri kuin lisäyksissä 2 ja 3 on määritelty,

— liuenneen hapen pitoisuus on 60-100 % ilman kyllästysarvosta koko testin ajan,

— veden lämpötila vaihtelee enintään ± 1,5 °C testiastioiden välillä tai peräkkäisinä päivinä milloin tahansa testin aikana ja on niissä rajoissa, jotka on määritelty kyseiselle testilajille (lisäykset 2 ja 3).

▼B

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Testiastiat**

Mitä tahansa lasista tai kemiallisesti inertistä materiaalista valmistettua astiaa voi käyttää. Astian pitäisi olla riittävän suuri kalamäärään nähden (ks. kohta 1.7.1.2). Suositellaan, että testiastiat sijoitetaan satunnaistetusti koealueelle. Satunnaistettu eristetty sijoittelu siten, että kussakin käsittelyssä olevia testiastioita on kussakin eristetyssä sijoituspaikassa, on parempi kuin täysin satunnaistettu järjestely, jos laboratoriossa on järjestelmällisiä vaikutuksia, jotka voidaan hallita eristyksellä. Jos eristystä käytetään, se on otettava huomioon tulostietojen käsittelyssä. Testiastiat olisi suojattava ei-toivotuilta häiriöiltä.

1.6.2 **Kalalajin valinta**

Suositeltavat kalalajit luetellaan taulukossa 1 A. Muitakin lajeja voidaan käyttää (esimerkkejä annetaan taulukossa 1 B), mutta testimenetelmää on silloin ehkä muutettava, jotta testiolosuhteet olisivat sopivat. Tällaisessa tapauksessa olisi selostettava syyt lajin ja koemenetelmän valitsemiseen.

1.6.3 **Siitoskalojen kasvatus**

Siitoskannan kasvatuksesta tyydyttävissä oloissa annetaan yksityiskohtaiset ohjeet OECD:n testiohjeessa nro 210 ([1]) ja viitteissä (2) (3) (4) (5) (6).

1.6.4 **Alkioiden ja toukkien käsittely**

Alkioiden ja toukkien altistus voidaan tehdä ison astian sisällä olevissa pienemmissä astioissa, joiden laidoissa tai päädyissä on verkot, jolloin testiliuos pääsee virtaamaan astian läpi. Pienten astioiden läpi johdetaan pyörteeton virtaus ripustamalla astiat varteen, jota voidaan nostaa ja laskea astiassa siten, että eliöt ovat nestepinnan alla koko ajan. Myös lappoa ja nesteenlisäysjärjestelmää voidaan käyttää. Hedelmöityneitä lohensukuisten kalojen munia voidaan pitää telineissä tai verkoissa, joiden reiät ovat niin suuret, että toukat putoavat niistä läpi kuoriuduttuaan. Pasteur-pipettejä voidaan käyttää alkioiden ja toukkien poistamiseksi puolistaattisissa testeissä, jossa neste vaihdetaan päivittäin (ks. kohta 1.6.6).

Jos munien pitämiseksi isossa testiastiassa käytetään telineitä, ritilöitä tai verkkoja, ne olisi poistettava toukkien kuoriutumisen jälkeen ([1]). Verkot pitäisi kuitenkin säilyttää kalojen karkaamisen estämiseksi. Jos toukkia on siirrettävä, niitä ei saisi ottaa vedestä ilmaan eikä verkkoja saisi käyttää kalojen irrottamiseksi munatelineistä (tämä varokeino ei ehkä ole tarpeen, jos käytetään kestävämpiä kalalajeja, kuten karppeja). Siirtoajankohta vaihtelee lajeittain, eikä siirto ehkä ole aina välttämätöntä. Puolistaattisessa menetelmässä voidaan käyttää dekanterilaseja tai matalia astioita, ja niihin voi tarvittaessa kiinnittää verkon hieman pohjan yläpuolelle. Jos astiat ovat riittävän suuria kalamäärään nähden (ks. 1.7.1.2), alkioita tai toukkia ei ehkä tarvitse siirtää.

([1]) OECD, Pariisi, 1992, Test Guideline 210, Fish. Early-life Stage Toxicity Test.

▼B

1.6.5 **Vesi**

Testivedeksi käy vesi, joka täyttää lisäyksessä 4 mainitut hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia koskevat vaatimukset ja jossa testilaji säilyy elossa vähintään yhtä kauan kuin lisäyksissä 2 ja 3 edellytetään. Veden laadun on oltava tasainen testin ajan. pH:n vaihtelu ei saisi olla suurempi kuin ± 0,5 pH-yksikköä. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa ainetta) tai haitallisesti siitoskalakannan vointiin, näytteitä olisi otettava säännöllisin väliajoin määrityksiä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), torjunta-aineet (esim. orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet olisi määritettävä esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrityksiä voidaan tehdä harvemmin (esim. kuuden kuukauden välein).

1.6.6 **Testiliuokset**

Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla.

Varastoliuos valmistetaan sekoittamalla testattava aine laimennusveteen käyttäen mieluiten mekaanisia menetelmiä tai ultraääntä. Saturaatiopylväitä (liukoisuuspylväitä) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Liuottimien tai dispergointiaineiden (liuotusapuaineiden) käyttöä on vältettävä, jos mahdollista. Ne voivat kuitenkin olla joskus välttämättömiä riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Sopivia liuottimia ovat esimerkiksi asetoni, etanoli, metanoli, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sopivia dispergointiaineita ovat esimerkiksi Cremophor RH40, Tween 80, 0,01-prosenttinen metyyliselluloosa ja HCO-40. Helposti biohajoavia aineita (kuten asetonia) ja/tai helposti haihtuvia aineita käytettäessä on oltava varovainen, koska ne voivat aiheuttaa ongelmia bakteerikasvuston takia läpivirtaustesteissä. Jos käytetään liuotusapuaineita, niillä ei saa olla merkittävää vaikutusta eloonjäämiseen eikä näkyviä haitallisia vaikutuksia varhaisiin kehitysvaiheisiin. Tämä on osoitettava pelkkää liuotinta sisältävällä kontrollilla. Tällaisten aineiden käyttöä on kuitenkin pyrittävä välttämään aina, kun se on mahdollista.

Puolistaattisessa testissä voidaan käyttää kahta eri liuoksenvaihtomenetelmää: i) uudet testiliuokset valmistetaan puhtaissa astioissa ja elossa pysyneet munat ja toukat siirretään varovasti uusiin astioihin pienessä määrässä vanhaa liuosta välttäen kosketusta ilman kanssa tai ii) testieliöt pidetään astioissa ja osa (vähintään kolme neljäsosaa) testivedestä vaihdetaan. Kasvatusnesteen vaihtoväli riippuu testiaineen stabiilisuudesta, mutta vaihtoa suositellaan kerran päivässä. Jos alustavista stabiilisuustesteistä (ks. kohta 1.4) tiedetään, ettei testiaineen pitoisuus pysy vakiona (ts. se ei ole välillä 80-120 % nimellisarvosta tai se laskee alle 80 prosentin mitatusta alkupitoisuudesta) vaihtojen välillä, olisi harkittava läpivirtaustestiä. Joka tapauksessa olisi varottava stressaamasta toukkia veden vaihdon yhteydessä.

▼B

Läpivirtaustesteissä on käytettävä testiaineen varastoliuosta jatkuvasti annostelevaa ja laimentavaa järjestelmää (esim. annostelupumppua, laimenninta, kyllästävää järjestelmää) testipitoisuuksien annostelemiseksi testiastioihin. Varastoliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saisi vaihdella enintään 10 % koko testin aikana. Virtausnopeus, joka on vähintään viisi kertaa testiastian tilavuus 24 tunnissa, on havaittu sopivaksi (2).

1.7 MENETTELY

Kirjallisuudesta löytyy hyödyllistä tietoa kalan alkio- ja ruskuaispussivaiheen myrkyllisyystestin suorituskyvystä. Joitakin esimerkkejä on tämän ohjeen kirjallisuusluettelossa (7) (8) (9).

1.7.1 **Altistusolosuhteet**

1.7.1.1 *Testin kesto*

Testi olisi aloitettava 30 minuutin kuluessa munien hedelmöityksestä. Alkiot upotetaan testiliuokseen ennen alkiolevyn jakaantumisvaihetta tai mahdollisimman pian sen jälkeen, ja joka tapauksessa ennen gastrulavaiheen alkamista. Jos munat on hankittu kaupalliselta toimittajalta, ei testiä voi ehkä aloittaa heti hedelmöityksen jälkeen. Koska testin herkkyys voi kärsiä huomattavasti aloituksen viivästymisen johdosta, testi olisi aloitettava 8 tunnin kuluessa hedelmöityksestä. Koska toukkia ei ruokita altistuksen aikana, testi olisi lopetettava juuri ennen kuin mahdollisten toukkien ruskuaispussi on imeytynyt täydellisesti yhdessäkään testiastiassa tai ennen kuin kontrolleissa havaitaan ravinnonpuutteesta johtuvia kuolemantapauksia.Testin kesto riippuu käytetystä lajista. Lisäyksissä 2 ja 3 annetaan joitakin suosituksia testin kestosta.

1.7.1.2 *Kalojen lisääminen testiastiaan*

Hedelmöityneiden munien määrän testin alussa pitäisi olla riittävä tilastollista käsittelyä varten. Munat olisi jaettava satunnaistetusti eri käsittelyryhmiin, ja yhtä pitoisuutta kohti olisi käytettävä vähintään 30 hedelmöitynyttä munaa tasaisesti jaettuina (tai niin tasaisesti kuin mahdollista, koska voi olla vaikeaa saada aikaan yhtä suuria eriä joillakin lajeilla) vähintään kolmeen rinnakkaiseen testiastiaan. Kalojen määrän (biomassa testiliuoksen tilavuusyksikköä kohti) pitäisi olla niin pieni, että liuenneen hapen pitoisuus voidaan pitää vähintään arvossa 60 % ilman ilmastusta. On suositeltu, että läpivirtaustesteissä kalojen määrä saa olla enintään 5 g/l per 24 tuntia ja enintään 5 g/l liuosta minä tahansa ajankohtana (2).

1.7.1.3 *Valo ja lämpötila*

Valoisan ajan ja testiveden lämpötilan pitäisi olla sopivia käytetylle testilajille (lisäykset 2 ja 3). Lämpötilan seurantaa varten voi olla tarpeen ylimääräinen testiastia.

▼B

1.7.2 **Testipitoisuudet**

Tavallisesti tarvitaan viisi testiaineen pitoisuutta, joiden välinen ero on vakio ja enintään 3,2-kertainen. Käyrää, jossa esitetään LC_{50} välittömän myrkyllisyystestin altistusajan funktiona, olisi käytettävä apuna valittaessa testipitoisuusaluetta. Vähemmän kuin viisi pitoisuutta voi olla riittävä määrä esim. raja-arvotesteissä, ja pitoisuuksien väli voi olla pienempi joissakin tapauksissa. Jos käytetään alle viittä testipitoisuutta, se on perusteltava. Pitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin 96 tunnin LC_{50}, tai 100 mg/l (näistä alhaisempi arvo), ei tarvitse testata. Kemikaaleja ei pitäisi testata niiden liukoisuusrajaa suuremmissa pitoisuuksissa.

Kun testiliuosten valmistuksessa käytetään jotakin liuotusapuainetta (ks. kohta 1.6.6), sen lopputilavuus testiastioissa ei saisi olla suurempi kuin 0,1 ml/1, ja tilavuuden pitäisi olla sama kaikissa testiastioissa.

1.7.3 **Kontrollit**

Testisarjan lisäksi on määritettävä yksi laimennusvesikontrolli (ja rinnakkaiset) sekä tapauksen mukaan yksi kontrolli, jossa on liuotusapuainetta (ja asianmukaiset rinnakkaiset).

1.7.4 **Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus**

Testiaineen pitoisuudet on määritettävä määräajoin testin aikana.

Suositellaan, että puolistaattisissa testeissä, joissa testiainepitoisuuden odotetaan pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta (ts. välillä 80-120 %; ks. kohta 1.4 ja 1.6.6), analysoidaan vähintään suurin ja pienin pitoisuus juuri valmistetusta liuoksesta ja juuri ennen liuoksen vaihtoa vähintään kolme kertaa testin aikana tasaisin väliajoin (ts. samasta liuoksesta otetaan näyte, kun liuos on juuri valmistettu ja liuosta vaihdettaessa).

Jos testiaineen pitoisuuden ei odoteta pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta (aineen stabiilisuutta koskevien tietojen perusteella), on analysoitava kaikki pitoisuudet tuoreesta liuoksesta ja liuosta vaihdettaessa noudattaen samanlaista järjestelmää (eli vähintään kolme kertaa testin aikana tasaisin väliajoin). Ennen liuoksen vaihtoa tehtävä määritys tarvitsee tehdä vain yhdestä rinnakkaisnäytteestä kullakin testipitoisuudella. Määritysten väli saa olla enintään seitsemän vuorokautta. Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos kuitenkin on näyttöä siitä, että testiaineen pitoisuus pysyy tyydyttävästi 20 prosentin sisällä nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää nimellispitoisuutta tai mitattua alkupitoisuutta.

Läpivirtaustesteille sopii samanlainen näytteenottojärjestelmä kuin puolistaattisille testeille (vaikka ”vanhoja” liuoksia ei mitata). Jos testi kuitenkin kestää yli seitsemän vuorokautta, voi olla suositeltavaa lisätä näytteiden lukumäärää ensimmäisen viikon aikana (esim. kolme sarjaa määrityksiä) sen varmistamiseksi, että testipitoisuudet ovat pysyneet stabiileina.

▼B

Näytteet voivat edellyttää sentrifugointia tai suodatusta (esim. 0,45 μm:n huokoskoon suotimella). Koska sen enempää sentrifugoimalla kuin suodattamallakaan ei aina pystytä erottamaan testiaineen biologisesti hyödyntämiskelvotonta osaa biologisesti hyödynnettävästä osasta, näytteille ei tarvitse välttämättä tehdä kyseisiä toimenpiteitä.

Liuennut happi, pH ja lämpötila on mitattava testin aikana kaikista testiastioista. Veden kokonaiskovuus ja suolapitoisuus, jos se on merkityksellinen, mitataan kontrolleista ja yhdestä astiasta, jossa on suurin pitoisuus. Liuennut happi ja suolapitoisuus, jos se on merkityksellinen, olisi mitattava kolmesti (testin alussa, keskivaiheilla ja lopussa). Suositellaan, että puolistaattisissa testeissä liuennut happi mitataan useammin, mieluiten ennen kutakin veden vaihtoa ja sen jälkeen tai vähintään kerran viikossa. pH olisi mitattava kunkin vedenvaihdon alussa ja lopussa puolistaattisissa testeissä ja vähintään viikoittain läpivirtaustesteissä. Kovuus olisi mitattava kerran testin aikana. Lämpötila olisi mitattava päivittäin, ja sitä olisi mielellään seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä testiastiassa.

1.7.5 **Havainnot**

1.7.5.1 *Alkiokehityksen vaiheet*

Alkiokehitysvaihe altistuksen alussa (ts. gastrulaatiovaihe) olisi varmistettava mahdollisimman tarkasti. Siinä voidaan käyttää sopivasti säilytettyä ja kirkastettua edustavaa näytettä munista. Kuvauksia ja kuvia alkiokehitykscn vaiheista löytyy kirjallisuudesta (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2 *Kuoriutuminen ja eloonjääminen*

Kuoriutumisesta ja eloonjäämisestä olisi tehtävä havaintoja vähintään kerran päivässä, ja yksilöiden lukumäärät on kirjattava. Voi olla toivottavaa tehdä havaintoja tiheämmin testin alussa (esim. 30 minuutin välein kolmen ensimmäisen tunnin aikana), koska joissakin tapauksissa elossapysymisaika voi olla merkityksellisempi kuin kuolemantapauksien lukumäärä (esim. silloin kun on välittömiä myrkkyvaikutuksia). Kuolleet alkiot ja toukat olisi poistettava heti, kun ne havaitaan, koska ne voivat hajota nopeasti. Kuolleita yksilöitä poistettaessa on oltava erittäin varovainen, ettei vieressä olevia munia tai toukkia kosketa tai vahingoiteta fyysisesti, sillä ne ovat hyvin herkkiä ja hauraita. Kuolemantapaukset todetaan eri kehitysvaiheessa eri tavoin:

— **munat:** erityisesti varhaisvaiheissa läpikuultavuus vähenee ja väri muuttuu, mikä johtuu valkuaisaineiden hyytymisestä ja/tai saostumisesta, josta on seurauksena valkoinen väri ja läpinäkymättömyys,

— **alkiot:** vartalo ei liiku ja/tai sydän ei lyö ja/tai läpinäkymättömyys tai värinmuutos sellaisessa lajissa, jonka alkiot ovat normaalisti läpikuultavia,

— **toukat:** toukat eivät liiku ja/tai niiden hengitysliikkeet puuttuvat ja/tai sydän ei lyö ja/tai keskushermosto on valkoinen ja läpinäkymätön ja/tai toukka ei reagoi mekaanisiin ärsykkeisiin.

▼B

1.7.5.3 *Epänormaali ulkonäkö*

Sellaisten toukkien, joiden ruumiinmuodossa havaitaan epänormaalisuutta ja/tai pigmentaatiota, lukumäärä, sekä ruskuaispussin absorptioaste olisi kirjattava määräajoin testin kestosta ja kuvatun epänormaalisuuden laadusta riippuen. Huomattakoon, että epänormaaleja alkioita ja toukkia esiintyy luonnollisesti, ja niiden määrä voi olla useita prosentteja kontroll(e)issa joissakin lajeissa. Epänormaalit eläimet olisi vain poistettava testiastioista, kun ne kuolevat.

1.7.5.4 *Epänormaali käyttäytyminen*

Epänormaali käyttäytyminen, esimerkiksi hyperventilaatio, koordinoimaton uinti ja epätyypillinen liikkumattomuus, olisi kirjattava sopivin väliajoin testin aikana. Vaikka tällaisia vaikutuksia on vaikea kvantifioida, niiden havainnoiminen voi auttaa kuolleisuusdatan tulkinnassa, ts. niistä voi saada tietoa aineen myrkkyvaikutuksen laadusta.

1.7.5.5 *Pituus*

Suositellaan, että testin lopussa mitataan yksilöiden pituus. Voidaan käyttää vakio-, lovi- tai kokonaispituutta. Jos pyrstöevä tai muut evät ovat syöpyneet, on käytettävä vakiopituutta. Hyvin tehdyssä testissä kontrollirinnakkaisten pituuden vaihtelukerroin saisi olla enintään 20 %.

1.7.5.6 *Paino*

Testin lopussa voidaan punnita yksittäiset eläimet. Kuivapaino (24 tuntia, 60 ^{o}C) on suositeltavampi kuin märkäpaino (eläimet kuivataan pinnalta). Hyvin tehdyssä testissä kontrollirinnakkaisten painon vaihtelukerroin saisi olla enintään 20 %.

Näistä havainnoista saadaan tietoja seuraaviin tilastollisiin analyyseihin:

— kertyvä kuolleisuus,

— terveiden toukkien lukumäärä testin lopussa,

— aika kuoriutumisvaiheen alkuun ja loppuun (ts. kun 90 % kuoriutunut kussakin rinnakkaisnäytteessä),

— kunakin päivänä kuoriutuneiden toukkien lukumäärä,

— elossa olevien eläinten pituus (ja paino) testin lopussa,

— epämuodostuneiden tai epätavalliselta näyttävien toukkien lukumäärä,

— epätavallisesti käyttäytyvien toukkien lukumäärä.

▼B

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Suositellaan, että sekä testin suunnittelussa että analysoinnissa on mukana tilastotieteilijä, koska menetelmä mahdollistaa huomattavan vaihtelun kokeen suunnittelussa. Esim. testiastioiden lukumäärä, testipitoisuuksien lukumäärä, hedelmöityneiden munien lukumäärä testin alussa ja mitattava muuttuja voivat vaihdella. Koska testi voidaan suunnitella monella tavalla, tässä ei anneta erityisohjeita tilastomenetelmistä.

Jos on tarkoitus arvioida LOEC/NOEC, on variaatiot analysoitava kussakin rinnakkaisten joukossa varianssianalyysillä (ANOVA) tai kontingenssitaulukkomenetelmillä. Jos halutaan tehdä yhteisvertailu yksittäisten pitoisuuksien ja kontrollien välillä, Dunnettin menetelmästä voi olla hyötyä (12) (13). Muitakin hyviä esimerkkejä on saatavilla (14) (15). ANOVAA tai muita menetelmiä käyttämällä saatujen vaikutusten suuruus (ts. testin suorituskyky) olisi laskettava ja ilmoitettava. On huomattava, etteivät kaikki kohdassa 1.7.5.6 luetellut havainnot sovellu ANOVA-analyysiin. Esimerkiksi kertyvä kuolleisuus ja testin lopussa elossa olevien toukkien määrät voitaisiin analysoida probittimenetelmillä.

Jos on tarkoitus arvioida LC/EC_X, olisi sovitettava sopiva(t) käyrä(t), kuten logistinen käyrä, kyseessä oleviin mittaustietoihin käyttäen jotakin tilastomenetelmää, kuten pienimmän neliösumman menetelmää tai epälineaarista pienimmän neliösumman menetelmää. Käyrissä on käytettävä sellaisia muuttujia, että haluttu LC/EC_x ja sen vakiopoikkeama voidaan estimoida suoraan. Se helpottaa suuresti luottamusrajojen laskemista LC/EC_x:lle. Sovitusmenetelmän olisi oltava sellainen, että sen avulla voitaisiin arvioida sovituksen onnistumisen (tai sen puutteen) merkitsevyys. Ellei ole painavia syitä muunsuuruisten luottamusvälien käyttöön, olisi ilmoitettava kaksipuolinen 95 prosentin luottamuusväli. Käyrien sovittamiseen voidaan käyttää graafisia menetelmiä. Regressioanalvysi soveltuu kaikkiin kohdassa 1.7.5.6 mainittuihin havaintoihin.

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Tulosten tulkinnassa on oltava varovainen, jos testiliuoksista mitatut myrkyllisen aineen pitoisuudet ovat lähellä määritysmenetelmän havaitsemisrajaa. Myös aineen liukoisuustuloa suuremmilla pitoisuuksilla saatujen tulosten tulkinnassa on oltava varovainen.

2.3 TEST1SELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

2.3.1 **Testiaine**

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä,

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan luettuna puhtaus, ja testiaineen kvantifiointiin käytettävä analyyttinen menetelmä (tarvittaessa).

▼B

2.3.2 **Testissä käytettävät kalalajit**

— tieteellinen nimi, kanta, siitoskalojen lukumäärä (ts. kuinka monta naarasta käytettiin testissä käytettyjen munien tuottamiseen), hedelmöityneiden munien toimittaja ja keräysmenetelmä sekä munien myöhempi käsittely.

2.3.3 **Koeolosuhteet:**

— käytetty testimenetelmätyyppi (esim. puolistaattinen tai läpivirtausmenetelmä, aika hedelmöitymisestä testin alkuun, testiastiaan lisättyjen emokalojen määrä),

— valoisa aika (valoisat aikajaksot),

— testin suunnittelu (esim. testiastioiden ja rinnakkaisten näytteiden lukumäärä, alkioiden määrä kussakin rinnakkaisastiassa),

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtojen väli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitettava, jos sellaista käytetään),

— nimelliset testipitoisuudet, mitatut arvot, niiden keskiarvot ja keskihajonnat testiastioissa, niiden laskemiseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset on tehty liuoksessa olevasta testiaineesta, mikäli testiaine on vesiliukoinen testipitoisuuksia pienemmissä pitoisuuksissa,

— laimennukseen käytetyn veden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet (jos ne on mitattu), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä, suspensiossa olevat kiinteät aineet, testiväliaineen suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja muut mahdolliset mittaukset,

— testiastioissa olevan veden laatu: pH, kovuus, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus.

2.3.4 **Tulokset:**

— mahdollisista alustavista kokeista saadut testiaineen stabiilisuutta koskevat tulokset,

— näyttö siitä, että kontrollit täyttivät yleiset testilajin elinkyvyn hyväksyttävyyttä koskevat vaatimukset (lisäykset 2 ja 3),

— alkio- ja toukkavaiheen sekä yleistä kuolleisuutta/elinkykyä koskevat tulokset,

— päivien lukumäärä kuoriutumiseen ja kuoriutuneiden toukkien lukumäärä,

— pituus (ja paino),

— mahdollisten epämuodostumien ilmaantuvuus ja kuvaus,

— mahdollisten käyttäytymismuutosten ilmaantuvuus ja kuvaus,

— tulosten tilastollinen analyysi ja käsittely,

— ANOVALLA analysoiduille testeille LOEC (pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus) arvolla $p = 0,05$ ja NOEC (pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta) kullekin arvioidulle vasteelle sekä käytettyjen tilastomenetelmien kuvaus ja ilmoitus havaitun vaikutuksen suuruudesta,

▼B

— regressiotekniikoilla arvioiduille testeille LC/EC_x ja luottamusvälit sekä sen laskemiseen käytetyn sovitusmallin kuvaaja.

— selitys mahdollisiin poikkeamiin tästä testimenetelmästä.

3. **LÄHDELUETTELO**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio)* Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoom A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout *(Salmo gairdneri)*. J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, B*rachydanio rerio.* Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish *(Danio rerio),* a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes.* EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, *(Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L, Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M, D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas)* larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

Taulukko 1 A

Kalalajit, joita suositellaan käytettäväksi testissä

Makean veden kalat
Oncorhynchus mykiss
Kirjolohi (9) (16)
Danio rerio
Seeprakala (7) (17) (18)
Cyprinus caprio
Karppi (8) (19)
Oryzias latipes
Medaka (20) (21)
Pimephales promelas
Paksupäämutu (8) (22)

▼B

Taulukko 1 B

Esimerkkejä muista hyvin dokumentoiduista lajeista, joita on myös käytetty

Makean veden kalat	Suolaisen veden kalat
Carassius auratus Kultakala (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (23) (24) (25)
Lepomis *macrochirus* Isoaurinkoahven (8)	*Clupea harengus* Silli (24) (25)
	Gadus morhua Turska (24) (25)
	Cyprinodon variegatus Loistohammaskarppi (23) (24) (25)

▼B

LISÄYS 1

OHJEITA SEEPRAKALAN (*BRACHYDANIO RERIO*) ALKIO- JA RUSKUAISPUSSIVAIHEEN POIKASILLA TEHTÄVÄN MYRKYLLISYYSTESTIN SUORITTAMISEKSI

JOHDANTO

Seeprakala on peräisin Intian Coromandel-rannikolta, jossa se asuu voimakkaasti virtaavissa joissa. Se on yleinen karpinsukuinen akvaariokala, ja ohjeita sen hoidosta ja kasvatuksesta annetaan trooppisia kaloja koskevissa kirjoissa. Seepra-kalan biologiaa ja käyttöä kalatutkimuksessa on selostettu viitteessä Laale (1).

Seeprakala on harvoin pitempi kuin 45 mm. Ruumis on lieriömäinen, ja siinä on 7–9 tummansinistä vaakasuoraa hopeanhohtavaa raitaa. Raidat päättyvät pyrstö- ja peräeviin. Selkä on oliivinvihreä. Koiraat ovat naaraita hoikempia. Naarailla on voimakkaampi hopeanväri kuin koirailla ja niiden vatsa on isompi, erityisesti ennen mätimunien laskua.

Aikuiset kalat sietävät suuria lämpötilan, pH:n ja veden kovuuden vaihteluja. Jotta kalat olisivat terveitä ja tuottaisivat hyvälaatuisia munia, niille on kuitenkin tarjottava hyvät elinolot.

Parittelun yhteydessä koiras jahtaa ja puskee naarasta, ja mätimunat hedelmöittyvät, kun naaras laskee munat. Munat ovat läpikuultavia ja liukkaita ja vajoavat pohjaan. Aikuiset kalat voivat syödä niitä. Valo vaikuttaa paritteluun. Jos aamuvalo on riittävä, seeprakala parittelee yleensä aamunkoiton jälkeisinä tunteina.

Naaras voi tuottaa useita satoja munia viikon välein.

EMOKALAT, LISÄÄNTYMINEN JA VARHAISET KEHITYSVAIHEET

Valitaan sopiva määrä terveitä kaloja ja pidetään niitä sopivanlaatuisessa vedessä (esim. lisäys 4) vähintään 2 viikkoa ennen aiottua parittelua. Kalaryhmän pitäisi antaa paritella vähintään kerran ennen kuin tuotetaan testiä varten tarkoitettu munaerä. Kalojen määrä tänä aikana saisi olla enintään 1 gramma kalaa litrassa. Kalojen määrä voi olla suurempi, jos vesi vaihdetaan säännöllisesti tai käytetään puhdistusjärjestelmää. Kasvatustankkien lämpötilan olisi oltava 25 ± 2 °C. Kaloille pitäisi antaa vaihtelevaa ravintoa, jossa voi olla esimerkiksi sopivaa kaupallista kuivarehua, eläviä vasta kuoriutuneita Arthemia-vesikirppuja, surviaissääskiä, Daphnia-vesikirppuja ja ankyrimatoja (Enchytracids).

Seuraavassa selostetaan kaksi menetelmää, joilla on saatu käytännössä riittävä määrä terveitä, hedelmöityneitä munia testiä varten:

i) Kahdeksan naarasta ja 16 koirasta pannaan tankkiin, jossa on 50 litraa laimennusvettä ja joka on suojattu suoralta auringonvalolta. Tankin annetaan olla mahdollisimman häiriöttä vähintään 48 tuntia. Testiä edeltävänä päivänä iltapäivällä akvaarion pohjalle asetetaan parittelutarjotin, jossa on 5–7 cm korkea kehys (pleksilasia tai muuta sopivaa materiaalia), 2–5 mm:n isoreikäinen verkko yläosassa ja 10–30 µm:n hieno verkko pohjassa. Kehyksen isoreikäiseen verkkoon kiinnitetään useita auki kierretystä nailonnarusta tehtyjä ”parittelupuita”. Kun kalat ovat olleet pimeässä 12 tuntia, sytytetään heikko valo, joka käynnistää parittelun. Kahdesta neljään tuntia parittelun jälkeen tarjotin otetaan pois ja munat kerätään. Tarjotin estää kaloja syömästä munia, ja samalla munat on helppo kerätä siitä. Kalaryhmän pitäisi antaa paritella vähintään kerran ennen kuin tuotetaan testiä varten tarkoitettu munaerä.

▼B

ii) Viidestä kymmeneen koiras- ja naaraskalaa kasvatetaan yksittäin vähintään 2 viikkoa ennen aiottua parittelua. 5–10 päivän kuluttua naaraiden vatsat ovat isot ja genitaalinystyt näkyviä. Koiraskaloilla ei ole kyseisiä nystyjä. Parittelu tapahtuu parittelutankeissa, joissa on verkosta tehty valepohja (kuten edellä). Tankki täytetään laimennusvedellä niin, että vettä on verkon päällä 5–10 cm. Yksi naaras ja kaksi koirasta pannaan tankkiin päivää ennen aiottua parittelua. Veden lämpötilaa nostetaan vähitellen yhden asteen korkeammalle kuin totutteluläm pötila. Valo sammutetaan ja tankki jätetään mahdollisimman häiriöttä. Aamulla sytytään heikko valo, joka käynnistää parittelun. Kahdesta neljään tuntia parittelun jälkeen kalat otetaan pois ja munat kerätään. Jos tarvitaan enemmän munia kuin yhdeltä naaraalta saadaan, käytetään useampia parittelutankkeja. Kirjaamalla yksittäisten naaraiden jälkeläistentuotto ennen testiä (munien määrä ja laatu) voidaan valita parhaimmat naaraat poikasten tuottoon.

Munat olisi siirrettävä testiastioihin ohuilla lasiputkilla (sisähalkaisija vähintään 4 mm), joissa on imututti. Munien kanssa tulevan veden määrän pitäisi olla mahdollisimman pieni. Munat ovat vettä raskaampia ja putoavat putkesta. Munat (ja toukat) eivät saisi joutua kosketuksiin ilman kanssa. Munista pitäisi ottaa näytteitä ja tutkia niitä mikroskoopissa sen varmistamiseksi, ettei ensimmäisissä kehitysvaiheissa esiinny epänormaaleja ilmiöitä. Munia ei saa desinfioida.

Munien kuolleisuus on suurin ensimmäisten 24 tunnin aikana hedelmöityksestä. Kuolleisuus on tänä aikana usein 5–40 prosenttia. Munat hajoavat hedelmöittymisen epäonnistumisen tai kehityshäiriöiden takia. Munien laatu näyttää riippuvan naaraista, koska jotkut naaraat tuottavat jatkuvasti hyvälaatuisia munia ja toiset eivät koskaan. Myös kehittymis- ja kuoriutumisnopeus vaihtelevat munaerien välillä. Jos munien hedelmöitys on onnistunut, munat ja ruskuaispussivaiheen toukat (eloonjäämisprosentti yli 90) pysyvät hyvin elossa. Munat kuoriutuvat 25 °C:n lämpötilassa 3–5 päivää hedelmöityksen jälkeen, ja ruskuaispussi absorboituu noin 13 päivää hedelmöityksen jälkeen.

Hisaoka ja Battle (2) ovat kuvanneet hyvin sikiökehityksen. Koska munat ja toukat (kuoriutumisen jälkeen) ovat läpinäkyviä, kalojen kehitystä voidaan seurata ja epämuodostumia havainnoida. Noin 4 tuntia parittelun jälkeen hedelmöitymättömät munat voidaan erottaa hedelmöityneistä (3). Tätä tutkimusta varten munat ja toukat pannaan pieniin astioihin ja niitä tarkastellaan mikroskoopissa.

Lisäyksessä 2 kuvataan varhaisiin kehitysvaiheisiin sovellettavat testiolosuhteet. Optimiarvo pH:lle on 7,8 ja laimennusveden kovuudelle 250 mg $CaCO_3$/l.

LASKUTOIMITUKSET JA TILASTOLLINEN KÄSITTELY

Suositellaan, että tulosten käsittelyssä on kaksi vaihetta. Ensin käsitellään tilastollisesti kuolleisuutta, epänormaalia kehittymistä ja kuoriutumisaikaa koskevat tulostiedot. Sitten arvioidaan tilastollisesti ruumiin pituus niillä pitoisuuksilla, joilla ei havaittu haitallisia vaikutuksia edellä mainituissa muuttujissa. Tällaista menettelyä suositellaan, koska myrkky saattaa tappaa selektiivisesti pieniä kaloja, viivästyttää kuoriutumista ja aiheuttaa vakavia epämuodostumia, mikä johtaa vääristyneisiin pituuden mittauksiin. Lisäksi tällä tavoin menettelemällä saadaan suunnilleen sama määrä kaloja käsittelyä kohti, mikä varmistaa testin validiteetin.

▼B

LC_{50}- JA EC-$_{50}$-MÄÄRITYKSET

Eloonjääneiden munien ja toukkien määrä lasketaan prosentteina ja korjataan kontrollien kuolleisuuden suhteen Abbottin kaavalla (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P}{C} \times 100\right)$$

jossa

P = korjattu eloonjäämisprosentti

P' = testipitoisuudessa havaittu eloonjäämisprosentti

C = kontrollien eloonjäämisprosentti

Jos mahdollista, LC_{50} määritetään sopivalla menetelmällä testin lopussa.

Jos EC_{50}-tilastoihin halutaan sisällyttää epämuotoisuudet, ohjeita on viitteessä Stephan (5).

LOEC:N JA NOEC:N ESTIMOINTI

Muna- ja ruskuaispussitestin tarkoitus on verrata kontrolleja ja nollasta poikkeavia pitoisuuksia, ts. määrittää LOEC. Sen vuoksi olisi käytettävä yhteisvertailumenetelmiä (6) (7) (8) (9) (10).

LÄHDELUETTELO

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121–173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173–181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1–333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. F. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69–81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096–1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482–491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103–117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519–531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Lisäys 2

TESTIOLOSUHTEET, TESTIN KESTO JA ELOONJÄÄMISKRITEERIT SUOSITELLUILLE LAJEILLE

Laji	Lämpötila CO	Suolapitoisuus (0/00)	Valoisa aika (tuntia)	Kehitysvaiheiden kesto (päivää)		Tyypillinen testin kesto	Kontrollien eloonjäämisprosentti (vähintään)	
				Alkio	Ruskuaispussi		Kuoriutumisprosentti	Kuoriutumisen jälkeen
MAKEAN VEDEN KALA								
Brachydanio rerio Seeprakala	25 ± 1	—	12–16	3-5	8–10	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 5 vrk kuoriutumisen jälkeen (8–10 vrk)	80	90
Oncorhynchus mykiss Kirjolohi	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (*)	30–35	25–30	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 20 vrk kuoriutumisen jälkeen (50–55 vrk)	66	70
Cyprinus carpio Karppi	21–25	—	12–16	5	> 4	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 4 vrk kuoriutumisen jälkeen (8–9 vrk)	80	75
Oryzias latipes Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12–16	8–11	4–8	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 5 vrk kuoriutumisen jälkeen 13–16 vrk)	80	80
Pimephales promelas Paksupäämutu	25 ± 2	—	16	4–5	5	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 4 vrk kuoriutumisen jälkeen (8–9 vrk)	60	70

(1) Alkioille.
(2) Toukille.
(*) Alkiot ja toukat pidetään pimeässä viikon ajan kuoriutumisen jälkeen paitsi silloin, kun niitä tarkastellaan. Sen jälkeen heikko valaistus testin loppuun asti.

▼B

Lisäys 3

Testiolosuhteet, testin kesto ja eloonjäämiskriteerit muille hyvin dokumentoiduille lajeille

Laji	Lämpötila (°C)	Suolapitoisuus (0/00)	Valoisa aika (tuntia)	Kehitysvaiheiden kesto (vrk)		Tyypillinen alkio- ja ruskuaispussivaihetestin kesto	Kontrollien eloonjaamisprosentti	
				Alkiovaihe	Ruskuais-pussivaihe		Kuoriutumisprosentti	Kuoriutumisen jälkeen
MAKEAN VEDEN KALAT								
Carassius auratus Kultakala	24 ± 1	—	—	3–4	> 4	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 4 vrk kuoriutumisen jälkeen (7 vrk)	—	80
Leopomis macrochirus Isoaurinkoahven	21 ± 1	—	16	3	> 4	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 4 vrk kuoriutumisen jälkeen (7 vrk)	—	75
SUOLAISEN VEDEN KALAT								
Menidia peninsulae Tidewater silverside	22–25	15–22	12	1,5	10	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 5 vrk kuoriutumisen jälkeen (6–7 vrk)	80	60
Clupea harengus Silli	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 3 vrk kuoriutumisen jälkeen (23–27 vrk)	60	80
Gadus morhua Turska	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 3 vrk kuoriutumisen jälkeen (18 vrk)	60	80
Cyprinodon variegatus Loistohammaskarppi	25 ± 1	15–30	12	—	—	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 4/7 vrk kuoriutumisen jälkeen (28 vrk)	> 75	80

▼B

Lisäys 4

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Aine	Pitoisuus
Kiinteät aineet	< 20 mg/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ammoniakki (ionisoitumaton)	< 1 µg/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä ja polyklooratut bifebyylit	< 50 ng/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

▼B

C.16. MEHILÄISET — SUUN KAUTTA TAPAHTUNEEN ALTISTUKSEN JÄLKEEN ILMENEVÄN VÄLITTÖMÄN MYRKYLLISYYDEN TESTI

1. MENETELMÄ

Tämä välittömän myrkyllisyyden testimenetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 213 (1998).

1.1 JOHDANTO

Tämä myrkyllisyystesti on laboratoriomenetelmä, jonka tarkoituksena on arvioida kasvinsuojeluaineiden ja muiden kemikaalien välitöntä myrkyllisyyttä täysikasvuisille työmehiläisille oraalisen eli suun kautta tapahtuneen altistuksen jälkeen.

Arvioitaessa kemikaalien myrkyllisiä ominaisuuksia voidaan vaatia välittömän myrkyllisyyden määrittämistä mehiläisillä oraalisen altistuksen jälkeen esimerkiksi silloin, kun mehiläisten altistuminen tietylle kemikaalille on todennäköistä. Välittömän myrkyllisyyden testi tehdään mehiläisille myrkyllisten torjunta-aineiden ja muiden kemikaalien aineelle ominaisen myrkyllisyyden määrittämiseksi. Testituloksien avulla määritellään lisäarvioinnin tarve. Tätä menetelmää voidaan käyttää erityisesti ohjelmissa, joissa torjunta-aineista mehiläisille aiheutuvaa vaaraa arvioidaan vaiheittain, jolloin laboratoriossa tehtävien myrkyllisyystestien jälkeen edetään puoliksi kenttäolosuhteissa tehtäviin kokeisiin ja kenttäkokeisiin (1). Torjunta-aineita voidaan testata sekä tehoaineina että valmisteina.

Mehiläisten herkkyyden ja testimenetelmän tarkkuuden todentamiseksi olisi käytettävä myrkyllistä standardia.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Välitön myrkyllisyys suun kautta: Haittavaikutukset, jotka ilmenevät enintään 96 tunnin kuluttua siitä, kun testiainetta on annettu yksi annos suun kautta.

Annos: Nautitun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan testiaineen massana (μg) testieläintä kohti (μg/mehiläinen). Todellista annosta kutakin mehiläistä kohti ei voida laskea, koska mehiläisiä ruokitaan yhtenä ryhmänä, mutta keskimääräinen annos voidaan arvioida (nautitun testiaineen kokonaismäärä / testimehiläisten lukumäärä yhdessä häkissä).

LD_{50} ((puolet tappava annos) suun kautta annosteltuna: Tilastollisesti laskettu yksittäinen annos, joka aiheuttaa kuoleman 50 %:ssa eläimistä suun kautta annosteltuna. LD_{50} ilmaistaan mikrogrammana testiainetta mehiläistä kohti. Kun on kysymys torjunta-aineesta, testiaine voi olla joko tehoaine tai valmiste, jossa on yksi tai useampia tehoaineita.

Kuolleisuus: Eläin katsotaan kuolleeksi, kun se on täysin liikkumaton.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Täysikasvuisia työmehiläisiä (*Apis mellifera)* altistetaan sarjalle sakkaroosiliuokseen liuotetun testiaineen annoksia. Mehiläisille annetaan tämän jälkeen sakkaroosiliuosta, jossa ei ole testiainetta. Kuolleisuus kirjataan päivittäin vähintään 48 tunnin ajan, ja sitä verrataan kontrolliarvoihin. Jos kuolleisuus lisääntyy 24 tunnin ja 48 tunnin välillä, mutta kontrollien kuolleisuus pysyy hyväksytyllä tasolla eli < 10 %, testiä jatketaan enintään 96 tuntiin saakka. Tulokset analysoidaan ja lasketaan 24 tunnin ja 48 tunnin LD_{50} sekä 72 tunnin ja 96 tunnin LD_{50}, jos testiä on jatkettu.

▼B

1.4 TESTIN LUOTETTAVUUS

Testi on luotettava, jos:

— keskimääräinen kuolleisuus kaikilla kontrolleilla ei ole suurempi kuin 10 % testin lopussa, ja

— myrkyllisen standardin LD_{50} on määritellyissä rajoissa.

1.5 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1 **Mehiläisten kerääminen**

Testissä olisi käytettävä samaa rotua olevia täysikasvuisia työmehiläisiä. Niiden pitäisi olla saman ikäisiä, samalla tavalla ruokittuja jne. Testimehiläisten olisi oltava asianmukaisesti ruokittuja ja hyväkuntoisia, niissä ei saisi olla tauteja ja ne olisi otettava emollisista pesistä. Yhdyskuntien fysiologinen tila ja aiempi historia pitäisi tuntea. Mehiläiset olisi kerättävä sen päivän aamuna, jolloin ne käytetään, tai edellisenä iltana ja pidettävä testiolosuhteissa seuraavaan päivään. Sikiöttömiltä kakuilta kerätyt mehiläiset ovat sopivia. Keräämistä aikaisin keväällä tai myöhään syksyllä olisi vältettävä, koska mehiläisten fysiologia on erilainen näinä aikoina. Jos testit on tehtävä aikaisin keväällä tai myöhään syksyllä, mehiläisten voi antaa kuoriutua lämpökaapissa ja niitä voi kasvattaa viikon verran ”mesileivällä” (kakusta kerätyllä siitepölyllä) ja sakkaroosiliuoksella. Kemiallisilla aineilla kuten antibiooteilla ja varroapunkkilääkkeillä käsiteltyjä mehiläisiä ei saisi käyttää myrkyllisyystesteihin neljään viikkoon viimeisen käsittelyn lopusta.

1.5.2 **Häkit ja ruokinta**

Häkkien on oltava helposti puhdistettavia ja niissä on oltava hyvä ilmanvaihto. Kaikkia sopivia materiaaleja voi käyttää, kuten ruostumatonta terästä, metalliverkkoa tai muovia, tai häkit voivat olla kertakäyttöisiä puuhäkkejä. Kymmenen mehiläistä häkkiä kohti on sopivin määrä. Testihäkkien on oltava kooltaan riittävän tilavia mehiläismäärälle.

Mehiläisiä olisi pidettävä pimeässä koehuoneessa lämpötilassa 25 ± 2 °C. Suhteellinen kosteus, jonka pitäisi olla normaalisti 50-70 %, olisi rekisteröitävä koko testin ajan. Käsittelytoimenpiteet ja havainnot voidaan suorittaa (päivän)valossa. Ravintona käytetään sakkaroosiliuosta, jonka pitoisuus on 500 g/l (50 % w/v). Testiannosten antamisen jälkeen ravintoa on annettava *ad libitum*. Ruokintajärjestelmän olisi oltava sellainen, että ravinnonotto voidaan rekisteröidä jokaista häkkiä kohti (ks. kohta 1.6.3.1). Ravinnon annosteluun voidaan käyttää lasiputkea, joka on n. 50 mm pitkä ja 10 mm paksu ja jonka pää kapenee niin, että halkaisija on noin 2 mm.

1.5.3 **Mehiläisten valmistelu**

Kerätyt mehiläiset jaetaan satunnaisesti testihäkkeihin, jotka sijoitetaan satunnaisesti koehuoneeseen.

▼B

Mehiläisiä voidaan pitää ilman ravintoa enintään 2 tuntia ennen testin alkua. Suositellaan, että mehiläisiä pidetään ilman ravintoa ennen käsittelyä, jotta niiden suolen sisältö olisi samanlainen testin alkaessa. Kuolevat mehiläiset on hylättävä, ja niiden tilalle on otettava terveitä mehiläisiä ennen testin aloittamista.

1.5.4 **Annosten valmistus**

Jos testiaine on vesiliukoinen, se voidaan liuottaa suoraan 50-prosenttiseen sakkaroosiliuokseen. Tekniset valmisteet ja huonosti vesiliukoiset aineet voidaan liuottaa esimerkiksi sellaisen orgaanisen liuottimen tai emulgointi- tai dispergointiaineen avulla, jonka myrkyllisyys mehiläisille on vähäinen (esim. asetoni, dimetyyliformamidi, dimetyylisulfoksidi). Liuotinapuaineen pitoisuus riippuu testiaineen liukoisuudesta, ja sen pitäisi olla sama kaikille testattaville pitoisuuksille. Yhden prosentin pitoisuus on yleensä hyväksyttävä, eikä sitä saisi ylittää.

On myös valmistettava asianmukaiset kontrolliliuokset. Jos testiaineen liuottamiseen on käytetty liuotinta tai dispergointiainetta, pitäisi käyttää kahta erillistä kontrolliaineiden ryhmää: toinen olisi vesiliuos ja toinen sakkaroosiliuos, jossa on liuotinta / kantaja-ainetta siinä pitoisuudessa kuin sitä käytetään annosteluliuoksissa.

1.6 TESTIN SUORITUS

1.6.1 **Testi- ja kontrolliryhmät**

Testiannosten ja rinnakkaismääritysten määrän on täytettävä tilastolliset vaatimukset LD_{50}:n määrittämiseksi 95 %:n luottamusvälein. Tavallisesti vaaditaan viisi annosta, joiden pitoisuudet ovat geometrisessa sarjassa, jonka kerroin on enintään 2,2, ja jotka kattavat LD_{50}:n määrittämiseksi tarvittavan pitoisuusalueen. Laimennustekijä ja annosteltavien pitoisuuksien lukumäärä on kuitenkin määriteltävä myrkyllisyyskäyrän (kuolleisuus annoksen funktiona) kulmakertoimen mukaan, ja tulosten analysointiin valittu tilastollinen menetelmä on myös otettava huomioon. Alustavilla testeillä on määriteltävä sopivat annostelupitoisuudet.

Sama testipitoisuusannos olisi annettava vähintään kolmelle rinnakkaiselle testiryhmälle, joista kussakin on kymmenen mehiläistä. Testisarjan lisäksi olisi oltava vähintään kolme kontrollierää, joista kussakin on kymmenen mehiläistä. Käytetyille liuottimille tai kantaja-aineille (ks. kohta 1.5.4) on oltava myös kontrollierät.

1.6.2 **Myrkyllinen standardi**

Testisarjassa on oltava myös myrkyllinen standardi. Siitä on oltava vähintään kolme annosta, jotka kattavat odotetun LD_{50}-arvon. Kutakin testiannosta varten on oltava vähintään kolme rinnakkaishäkkiä, joista kussakin kymmenen mehiläistä. Suositeltava myrkyllinen standardi on dimetoaatti, jonka 24 tunnin LD_{50}-arvon on raportoitu olevan alueella 0,10 - 0,35 µg tehoainetta / mehiläinen (2). Muutkin myrkylliset standardit ovat hyväksyttäviä, jos toimitetaan riittävästi tietoja odotetun annos-vastesuhteen todentamiseksi (esim. parationi).

▼B

1.6.3 **Altistus**

1.6.3.1 *Antotapa*

Kullekin mehiläisten testiryhmälle on annettava 100-200 µl 50-prosenttista sakkaroosin vesiliuosta, joka sisältää testiainetta sopivassa pitoisuudessa. Aineille, jotka ovat niukkaliukoisia, joiden myrkyllisyys on vähäinen tai joiden pitoisuus valmisteessa on pieni, tarvitaan suurempi nestetilavuus, koska on käytettävä aineiden suurempia osuuksia sakkaroosiliuoksessa. Ryhmää kohti kulunutta käsitellyn ravinnon määrää on seurattava. Kun ravinto on nautittu (tavallisesti 3-4 tunnin kuluessa), ruokintalaite on poistettava häkistä ja sen tilalle on pantava pelkästään sakkaroosiliuosta. Sitä annetaan sitten *ad libitum*. Joitakin aineita mehiläiset eivät ehkä syö, kun aineiden pitoisuus on suuri. Enintään 6 tunnin kuluttua nauttimatta jäänyt käsitelty ravinto otetaan pois ja korvataan sakkaroosiliuoksella. Nautitun käsitellyn ravinnon määrä on arvioitava (esim. mittaamalla jäljelle jääneen ravinnon tilavuus / paino).

1.6.3.2 *Testin kesto*

Testin kestoksi suositellaan 48 tuntia sen jälkeen kun testiliuos on korvattu sakkaroosiliuoksella. Jos kuolleisuus nousee edelleen yli 10 prosentilla ensimmäisten 24 tunnin jälkeen, koetta on jatkettava enintään 96 tuntiin saakka edellyttäen, ettei kontrollien kuolleisuus ole suurempi kuin 10 %.

1.6.4 **Havainnot**

Kuolleisuus kirjataan 4 tunnin kuluttua testin alusta ja sen jälkeen 24 tunnin ja 48 tunnin kuluttua (ts. annoksen antamisesta). Jos on tarpeen jatkaa havainnointia, havainnot on tehtävä 24 tunnin välein enintään 96 tuntiin saakka.

Ryhmää kohti kuluneen ravinnon määrä olisi arvioitava. Vertaamalla käsitellyn ja käsittelemättömän ravinnon nauttimisnopeutta 6 tunnin kuluessa voidaan saada käsitys käsitellyn ravinnon maittavuudesta.

Kaikki epänormaali käyttäytyminen testauksen aikana on kirjattava.

1.6.5 **Raja-annostesti**

Joissakin tapauksissa (esim. kun testiaineen myrkyllisyys oletetaan alhaiseksi) voidaan tehdä raja-arvotesti, jolloin käytetään 100 µg tehoainetta mehiläistä kohti sen osoittamiseksi, että LD_{50} on kyseistä arvoa suurempi. Raja-annostestissä olisi käytettävä samaa menettelyä kuin varsinaisessa testissä, ts. siinä on oltava kolme rinnakkaistestiryhmää annosta kohti, tarvittavat kontrollit, myrkyllinen standardi, ja nautitun käsitellyn ravinnon määrä on arvioitava. Jos esiintyy kuolleisuutta, on tehtävä täydellinen tutkimus. Jos havaitaan subletaaleja vaikutuksia (ks. kohta 1.6.4), ne on kirjattava.

▼B

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Määritystulokset on esitettävä taulukoituna, ja esityksestä on käytävä ilmi kussakin testiryhmässä sekä kontrolliryhmässä ja myrkyllistä standardia saaneessa ryhmässä käytettyjen mehiläisten lukumäärä, kuolleisuus kunakin havainnointihetkenä ja niiden mehiläisten lukumäärä, joissa havaitaan haittavaikutuksia. Kuolleisuustulokset on analysoitava sopivilla tilastomenetelmillä (esim. probittianalyysi, liukuva keskiarvo, binomiaalinen todennäköisyys) (3) (4). Annos-vastekuvaajat tehdään kutakin suositeltua havainnointiajankohtaa kohti, ja kuvaajien kulmakertoimet ja puolet tappava annos (LD_{50}) lasketaan 95 prosentin luottamusvälillä. Kontrollikuolleisuudesta johtuvat korjaukset voitaisiin tehdä Abbottin korjauksella (4) (5). Jos käsiteltyä ravintoa ei ole nautittu kokonaan, olisi määritettävä nautitun testiaineen annos ryhmää kohti. LD_{50}, olisi ilmaistava mikrogrammoina testiainetta mehiläistä kohti.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on oltava seuraavat tiedot:

2.2.1 **Testiaine:**

— fysikaalinen olomuoto ja asian kannalta merkitsevät fysikokemialliset ominaisuudet (esim. stabiilisuus vedessä, höyrynpaine),

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan lukien rakennekaava ja puhtaus (ts. torjunta-aineille tunnistetiedot ja tehoaine(id)en pitoisuus).

2.2.2 **Testilaji:**

— tieteellinen nimi, rotu, ikä suunnilleen (viikkoa), keräysmenetelmä, keräyspäivä,

— testimehiläisten keräykseen käytettyjä pesiä koskevat tiedot, mukaan lukien esim. mehiläisten terveydentila, mahdolliset täysikasvuisten taudit, mahdolliset esikäsittelyt.

2.2.3 **Testiolosuhteet:**

— koetilojen lämpötila ja suhteellinen kosteus,

— häkkien tyyppi, koko ja materiaali,

— varasto- ja testiliuosten valmistusmenetelmät (jos on käytetty liuotinta, sen nimi ja pitoisuus on mainittava),

— testin suunnittelu, esim. testipitoisuudet ja niiden määrä, kontrollien lukumäärä sekä kutakin testipitoisuutta ja kontrollia kohti rinnakkaisten häkkien määrä ja mehiläisten määrä häkkiä kohti,

— testin päivämäärä.

▼B

2.2.4 **Tulokset:**

— mahdolliset alustavan annosaluetutkimuksen tulokset,

— käsittelemättömät tulokset: kuolleisuus kullakin testipitoisuudella ja kullakin havainnointihetkellä,

— annos-vastekuvaajat testin lopussa,

— testiaineen ja myrkyllisen standardin LD_{50}-arvot 95 prosentin luottamusvälein kullakin suositellulla havainnointihetkellä,

— LD_{50}-arvon määrittämiseen käytetyt tilastomenetelmät,

— kontrollien kuolleisuus,

— muut havaitut tai mitatut biologiset vaikutukset ja mehiläisissä mahdollisesti havaitut epänormaalit vasteet,

— mahdolliset poikkeamat tässä kuvatuista testimenettelyistä ja kaikki mahdollisesti tärkeät tiedot.

3. **LÄHDELUETTELO**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield. J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B

C.17 MEHILÄISET — KOSKETUSALTISTUKSEN JÄLKEEN ILMENEVÄN VÄLITTÖMÄN MYRKYLLISYYDEN TESTI

1. MENETELMÄ

Tämä välittömän myrkyllisyyden testimenetelmä on toisinto OECD:n testausohjeesta N:o 214 (1998).

1.1 JOHDANTO

Tämä myrkyllisyystesti on laboratoriomenetelmä, jonka tarkoituksena on arvioida kasvinsuojeluaineiden ja muiden kemikaalien välitöntä myrkyllisyyttä täysikasvuisille työmehiläisille kosketusaltistuksen jälkeen.

Arvioitaessa kemikaalien myrkyllisiä ominaisuuksia voidaan vaatia välittömän myrkyllisyyden määrittämistä mehiläisillä kosketusaltistuksen jälkeen esimerkiksi silloin, kun mehiläisten altistuminen tietylle kemikaalille on todennäköistä. Kosketusaltistuksen jälkeen ilmenevän välittömän myrkyllisyyden testin tarkoituksena on määrittää mehiläisille myrkyllisten torjunta-aineiden ja muiden kemikaalien aineelle ominainen myrkyllisyys. Testituloksien avulla määritellään lisäarvioinnin tarve. Tätä menetelmää voidaan käyttää erityisesti ohjelmissa, joissa torjunta-aineista mehiläisille aiheutuvaa vaaraa arvioidaan vaiheittain, jolloin laboratoriossa tehtävien myrkyllisyystestien jälkeen edetään puoliksi kenttäolosuhteissa tehtäviin kokeisiin ja kenttäkokeisiin (1). Torjunta-aineita voidaan testata sekä tehoaineina että valmisteina.

Mehiläisten herkkyyden ja testimenetelmän tarkkuuden todentamiseksi olisi käytettävä myrkyllistä standardia.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kosketusaltistuksen jälkeen ilmenevä välitön myrkyllisyys: Haittavaikutukset, jotka ilmenevät enintään 96 tunnin kuluttua siitä, kun testiainetta on aplikoitu paikallisesti yksi annos.

Annos: Aplikoidun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan testiaineen massana (μg) testieläintä kohti (μg/mehiläinen).

LD_{50} (puolet tappava annos) ihon kautta annosteltuna: Tilastollisesti laskettu yksittäinen annos, joka aiheuttaa kuoleman 50 %:ssa eläimistä ihon kautta annosteltuna. LD_{50} ilmaistaan mikrogrammana testiainetta mehiläistä kohti. Kun on kysymys torjunta-aineesta, testiaine voi olla joko tehoaine tai valmiste, jossa on yksi tai useampia tehoaineita.

Kuolleisuus: Eläin katsotaan kuolleeksi, kun se on täysin liikkumaton.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Täysikasvuisia työmehiläisiä *(Apis mellifera)* altistetaan sopivaan kantaja-aineeseen liuotetun testiaineen annoksille siten, että ainetta aplikoidaan suoraan rintakehälle (tippoina). Testin kesto on 48 h. Jos kuolleisuus kasvaa 24 tunnin ja 48 tunnin välillä kontrollien kuolleisuuden pysyessä hyväksyttävällä tasolla, ts. < 10 %, testiä pitäisi jatkaa enintään 96 tuntiin saakka. Kuolleisuus kirjataan päivittäin, ja sitä verrataan kontrolliarvoihin. Tuloksista lasketaan LD_{50} 24 tunnin ja 48 tunnin kuluttua sekä 72 tunnin ja 96 tunnin kuluttua, jos testiä on jatkettu.

▼B

1.4 TESTIN LUOTETTAVUUS

Testi on luotettava, jos:

— keskimääräinen kuolleisuus kaikilla kontrolleilla ci ole suurempi kuin 10 % testin lopussa, ja

— myrkyllisen standardin LD_{50} on määritellyissä rajoissa.

1.5 TESTIN KUVAUS

1.5.1 **Mehiläisten kerääminen**

Testiin pitäisi käyttää nuoria täysikasvuisia työmehiläisiä, ts. sellaisia, jotka ovat saman ikäisiä, samalla tavoin ruokittuja, saman rotuisia jne. Testimehiläisten olisi oltava asianmukaisesti ruokittuja ja hyväkuntoisia, niissä ei saisi olla tauteja ja ne olisi kerättävä emollisista pesistä, joiden fysiologinen tila ja aiempi historia tunnetaan. Mehiläiset olisi kerättävä sen päivän aamuna, jolloin ne käytetään, tai edellisenä iltana ja pidettävä testiolosuhteissa seuraavaan päivään. Sikiöttömiltä kakuilta kerätyt mehiläiset ovat sopivia. Keräämistä aikaisin keväällä tai myöhään syksyllä olisi vältettävä, koska mehiläisten fysiologia on erilainen näinä aikoina. Jos testit on tehtävä aikaisin keväällä tai myöhään syksyllä, mehiläisten voi antaa kuoriutua lämpökaapissa ja niitä voi kasvattaa viikon verran ”mesileivällä” (kakusta kerätyllä siitepölyllä) ja sakkaroosiliuoksella. Kemiallisilla aineilla kuten antibiooteilla ja varroapunkkilääkkeillä käsiteltyjä mehiläisiä ei saisi käyttää myrkyllisyystesteihin neljään viikkoon viimeisen käsittelyn lopusta.

1.5.2 **Häkit ja ruokinta**

Häkkien on oltava helposti puhdistettavia ja niissä on oltava hyvä ilmanvaihto. Kaikkia sopivia materiaaleja voi käyttää, kuten ruostumatonta terästä, metalliverkkoa tai muovia, tai häkit voivat olla kertakäyttöisiä puuhäkkejä. Testihäkkien on oltava kooltaan riittävän tilavia mehiläismäärälle. Kymmenen mehiläistä häkkiä kohti on sopivin määrä

Mehiläisiä olisi pidettävä pimeässä koehuoneessa lämpötilassa 25 ± 2 °C. Suhteellinen kosteus, jonka pitäisi olla normaalisti 50-70 %, olisi rekisteröitävä koko testin ajan. Käsittelytoimenpiteet ja havainnot voidaan suorittaa (päivän)valossa. Ravintona käytetään sakkaroosiliuosta, jonka pitoisuus on 500 g/l (50 % w/v), ja sitä annetaan *ad libitum* testin ajan annostelulaitteen avulla, joka voi olla lasiputki (n. 50 mm pitkä ja 10 mm paksu ja jonka pää kapenee niin, että halkaisija on noin 2 mm).

1.5.3 **Mehiläisten valmistelu**

Mehiläiset voidaan keräyksen jälkeen anestesoida hiilidioksidilla tai typpikaasulla, jotta testiaine voidaan aplikoida. Anestesia-ainetta on käytettävä mahdollisimman pieni määrä ja mahdollisimman lyhyen aikaa. Kuolevat mehiläiset on hylättävä, ja niiden tilalle on otettava terveitä mehiläisiä ennen testin aloittamista.

1.5.4 **Annosten valmistelu**

Testiaine aplikoidaan kantaja-aineeseen, ts. orgaaniseen liuottimeen tai veteen tehtynä liuoksena, jossa on vettymistä edistävää ainetta. Orgaanisista liuottimista suositeltavin on asetoni, mutta muitakin orgaanisia liuottimia, joiden myrkyllisyys mehiläisille on vähäinen, voidaan käyttää (esim. dimetyyliformamidia tai dimetyylisulfoksidia). Orgaanisiin kantaja-aineisiin liukenemattomien veteen dispergoitujen valmisteiden ja erittäin polaaristen orgaanisten kemikaalien aplikointi voi olla helpompaa, jos niiden liuokset tehdään laimeaan kaupalliseen vettymistä edistävään aineeseen (esim. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Testissä olisi käytettävä asianmukaisia kontrolliliuoksia, ts. jos testiaineen liuottamiseen on käytetty liuotinta tai dispergointiainetta, pitäisi käyttää kahta erillistä kontrolliryhmää: sellaista, joka on käsitelty vedellä ja sellaista, joka on käsitelty liuottimella tai dispergointiaineella.

1.6 TESTIN SUORITUS

1.6.1 **Testi- ja kontrolliryhmät**

Testiannosten ja rinnakkaismääritysten määrän on täytettävä tilastolliset vaatimukset LD_{50}:n määrittämiseksi 9 5 %:n luottamusvälein. Tavallisesti vaaditaan viisi annosta, joiden pitoisuudet ovat geometrisessa sarjassa, jonka kerroin on enintään 2,2, ja jotka kattavat LD_{50}:n määrittämiseksi tarvittavan pitoisuusalueen. Annosteltavien pitoisuuksien lukumäärä on kuitenkin määriteltävä myrkyllisyyskäyrän (kuolleisuus annoksen funktiona) kulmakertoimen mukaan, ja tulosten analysointiin valittu tilastollinen menetelmä on myös otettava huomioon. Alustavilla testeillä on määriteltävä sopivat annostelupitoisuudet.

Sama testipitoisuusannos olisi annettava vähintään kolmelle rinnakkaiselle testiryhmälle, joista kussakin on kymmenen mehiläistä.

Testisarjan lisäksi olisi oltava vähintään kolme kontrollierää, joista kussakin on kymmenen mehiläistä. Jos käytetään orgaanista liuotinta tai vettymistä edistävää ainetta, on testissä oltava myös orgaanista liuotinta tai vettymistä edistävää ainetta varten kolme kontrollierää, joista kussakin on kymmenen mehiläistä.

1.6.2 **Myrkyllinen standardi**

Testisarjassa on oltava myös myrkyllinen standardi. Siitä on oltava vähintään kolme annosta, jotka kattavat odotetun LD_{50}-arvon. Kutakin testiannosta varten on oltava vähintään kolme rinnakkaishäkkiä, joista kussakin kymmenen mehiläistä. Suositeltava myrkyllinen standardi on dimetoaatti, jonka 24 tunnin LD_{50}-arvo on alueella 0,10 - 0,30 μg tehoainetta / mehiläinen (2). Muutkin myrkylliset standardit ovat hyväksyttäviä, jos toimitetaan riittävästi tietoja odotetun annos-vastesuhteen todentamiseksi (esim. parationi).

1.6.3 **Altistus**

1.6.3.1 *Antotapa*

Anestesoidut mehiläiset käsitellään yksitellen. Mehiläiset jaetaan satunnaistetusti eri testiannos- ja kontrolliryhmiin. Liuosta, joka sisältää 1 mikrolitran testiainetta sopivassa pitoisuudessa, aplikoidaan mikroaplikaattorilla kunkin mehiläisen rintakehän selkäpuolelle. Muita tilavuuksia voi käyttää, jos se on perusteltua. Mehiläiset jaetaan aplikaation jälkeen testihäkkeihin ja niille annetaan sakkaroosiliuosta.

1.6.3.2 *Testin kesto*

Testin keston olisi oltava mieluiten 48 tuntia. Jos kuolleisuus nousee edelleen yli 10 prosentilla 24 tunnin ja 48 tunnin välillä, testiä on jatkettava, kuitenkin enintään 96 tuntiin saakka, edellyttäen, ettei kontrollien kuolleisuus ole suurempi kuin 10 %.

▼B

1.6.4 **Havainnot**

Kuolleisuus kirjataan 4 tunnin kuluttua annostelusta ja 24 tunnin sekä 48 tunnin kuluttua. Jos on tarpeen jatkaa havainnointia, havaintoja on tehtävä 24 tunnin väliajoin enintään 96 tuntiin saakka, mikäli kontrollikuolleisuus ei ylitä 10:tä prosenttia.

Kaikki epänormaali käyttäytyminen testin aikana on kirjattava.

1.6.5 **Raja-annostesti**

Joissakin tapauksissa (esim. kun testiaineen myrkyllisyys oletetaan alhaiseksi) voidaan tehdä raja-arvotesti, jolloin käytetään 100 μg tehoainetta mehiläistä kohti sen osoittamiseksi, että LD_{50} on kyseistä arvoa suurempi. Raja-annostestissä olisi käytettävä samaa menettelyä kuin varsinaisessa testissä, ts. siinä on oltava kolme rinnakkaistestiryhmää annosta kohti, tarvittavat kontrollit ja myrkyllinen standardi. Jos esiintyy kuolleisuutta, on tehtävä täydellinen tutkimus. Jos havaitaan subletaaleja vaikutuksia (ks. kohta 1.6.4), ne on kirjattava.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Määritystulokset on esitettävä taulukoituna, ja esityksestä on käytävä ilmi kussakin testiryhmässä sekä kontrolliryhmässä ja myrkyllistä standardia saaneessa ryhmässä käytettyjen mehiläisten lukumäärä, kuolleisuus kunakin havainnointihetkenä ja niiden mehiläisten lukumäärä, joissa havaitaan haittavaikutuksia. Kuolleisuustulokset on analysoitava sopivilla tilastomenetelmillä (esim. probittianalyysi, liukuva keskiarvo, binomiaalinen todennäköisyys) (3) (4). Annos-vastekuvaajat tehdään kutakin suositeltua havainnointiajankohtaa (ts. 24, 48 ja tarvittaessa 72 ja 96 tuntia) kohti, ja kuvaajien kulmakertoimet ja puolet tappava annos (LD_{50}) lasketaan 95 prosentin luottamusvälillä. Kontrollikuolleisuudesta johtuvat korjaukset voitaisiin tehdä Abbottin korjauksella (4) (5). $LD_{5()}$ olisi ilmaistava mikrogrammoina testiainetta mehiläistä kohti.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on oltava seuraavat tiedot:

2.2.1 **Testiaine:**

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet (esim. stabiilisuus vedessä, höyrynpaine),

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan lukien rakennekaava ja puhtaus (ts. torjunta-aineille tunnistetiedot ja tehoaine(id)en pitoisuus).

2.2.2 **Testilajit:**

— tieteellinen nimi, rotu, ikä suunnilleen (viikkoa), keräysmenetelmä, keräyspäivä,

— testimehiläisten keräykseen käytettyjä pesiä koskevat tiedot, mukaan lukien esim. mehiläisten terveydentila, mahdolliset täysikasvuisten taudit, mahdolliset esikäsittelyt.

▼B

2.2.3 **Testiolosuhteet:**

— koetilojen lämpötila ja suhteellinen kosteus,

— häkkien tyyppi, koko ja materiaali,

— testiaineen antotapa, esim. käytetty kantaja-aine, aplikoidun testiliuoksen tilavuus, käytetty anestesia-aine,

— testin suunnittelu, esim. testiannokset ja niiden lukumäärä, kontrollien lukumäärä sekä kutakin testiannosta ja kontrollia kohti rinnakkaisten häkkien määrä ja mehiläisten määrä häkkiä kohti,

— testin päivämäärä.

2.2.4 **Tulokset:**

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset,

— käsittelemättömät tulokset: kuolleisuus kullakin testipitoisuudella ja kullakin havainnointihetkellä,

— annos-vastekuvaajat testin lopussa,

— testiaineen ja kontrollin LD_{50}-arvot 95 % prosentin luottamusvälein kullakin havainnointihetkellä,

— LD_{50}-arvon määrittämiseen käytetyt tilastomenetelmät,

— kontrollien kuolleisuus,

— muut havaitut tai mitatut biologiset vaikutukset ja mehiläisten mahdolliset epänormaalit vasteet,

— mahdolliset poikkeamat tässä kuvatuista testimenettelyistä ja kaikki mahdollisesti tärkeät tiedot.

3. **VIITTEET**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 8, pp. 265-267.

▼B

C.18 **ADSORPTIO/DESORPTIO ERÄTASAPAINOMENETELMÄÄ KÄYTTÄEN**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on toisinto OECD TG 106:sta, maa-aineksen adsorptio/desorptio-ominaisuuksien määrittämiseksi erätasapainomenetelmää käyttäen (2000).

1.1 JOHDANTO

Menetelmässä otetaan huomioon ”ring”-testi sekä maa-aineksen valitsemista koskeva seminaari (1) (2) (3) (4) adsorptiotestin kehittämiseksi samoin kuin kansallisella tasolla käytettävät ohjeet (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Adsorptio- ja desorptiotutkimuksista saadaan hyödyllisiä tietoja kemikaalien kulkeutumisesta ja niiden jakautumisesta biosfäärin maa-, vesi- ja ilmakerroksiin (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Tietoja voidaan käyttää esimerkiksi sen ennustamiseksi tai arvioimiseksi, miten kemikaalit hajoavat (22) (23), muuntuvat tai joutuvat eliöihin (24), uuttuvat maalajien läpi (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), haihtuvat maa-aineksesta (21) (29) (30) tai huuhtoutuvat maan pintakerroksista luonnonvesiin (18) (31) (32). Adsorptiotietoja voidaan käyttää vertailu- ja mallintamistarkoituksiin (19) (33) (34) (35).

Kemikaalin jakautuminen maa-ainekseen ja vesifaasiin on monimutkainen prosessi, joka riippuu lukuisista eri tekijöistä: aineen kemiallisesta luonteesta (12) (36) (37) (38) (39) (40), maa-aineksen ominaisuuksista (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) sekä ilmastollisista tekijöistä kuten sateista, lämpötilasta, auringosta ja tuulista. Näin ollen kemikaalin maa-aineksessa tapahtuvaan adsorptioprosessiin liittyviä moninaisia ilmiöitä ja mekanismeja ei voida täysin määritellä yksinkertaistetulla laboratoriomallilla, kuten tässä esitetyllä menetelmällä. Vaikka tällä menetelmällä ei ole mahdollista kattaa kaikkia ympäristön kannalta mahdollisia tapauksia, se antaa kuitenkin riittävästi tietoa kemikaalin adsorboitumisesta ympäristön kannalta merkityksellisellä tavalla.

Katso myös yleinen johdanto.

1.2 SOVELTAMISALA

Menetelmän tarkoituksena on arvioida, miten kemikaalit adsorboituvat maa-ainekseen tai desorboituvat siitä. Tavoitteena on saada sorptioarvo, jota voidaan käyttää ennustamaan jakautumista erilaisissa ympäristöolosuhteissa; tätä varten määritetään tasapainotilan adsorptiokertoimet kemikaalille erilaisissa maa-aineksissa maa-aineksen ominaisuuksien (esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus, savipitoisuus ja maaperän rakenne sekä pH) funktiona. On käytettävä erilaisia maalajeja, jotta tietyn aineen ja luonnossa esiintyvien maa-ainesten väliset vuorovaikutukset voidaan kattaa mahdollisimman laajasti.

Tässä menetelmässä adsorptio edustaa kemikaalin sitoutumista maa-ainesten pintakerroksiin; siinä ei erotella erilaisia adsorptioprosesseja (fysikaalinen ja kemiallinen adsorptio) eikä esim. pintakatalysoitua hajoamista, massa-adsorptiota tai kemiallista reaktiota. Adsorptiota, joka tapahtuu maa-aineksesta syntyviin kolloidipartikkeleihin (halkaisija $< 0{,}2$ μm), ei ole otettu huomioon.

▼B

Tärkeimpinä adsorptiokäyttäytymiseen vaikuttavina maa-ainekseen liittyvinä muuttujina pidetään orgaanisen hiilen pitoisuutta (3) (4) (12) (13) (14) (41) (4 3) (44) (45) (46) (47) (48); savipitoisuutta ja maaperän rakennetta (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) sekä ionisoituvien yhdisteiden pH:ta (3) (4) (42). Muut maa-ainekseen liittyvät muuttujat, joilla saattaa olla vaikutusta tietyn aineen adsorptioon/desorptiooon ovat efektiivinen kationinvaihtokyky (ECEC), amorfisen raudan ja alumiinioksidien pitoisuus, erityisesti tulivuorialueiden ja trooppisten maa-ainesten (4) tapauksessa, samoin kuin ominaispinta-ala (49) ovat tärkeitä.

Testillä on tarkoitus arvioida kemikaalin adsorboitumista erityyppisiin maalajeihin, joiden orgaanisen hiilen pitoisuus, savipitoisuus ja maaperän rakenne sekä pH vaihtelevat eri tavoin. Testi käsittää kolme tasoa:

Taso 1 : Alustava tutkimus, jolloin määritetään:

— maa-aines/liuos-suhde,

— adsorptiotasapainotilan saavuttamiseksi tarvittava aika ja adsorboituneen testiaineen määrä tasapainotilassa,

— testiaineen adsorboituminen koeastioiden pintoihin sekä testiaineen stabiilius testijakson aikana.

Taso 2 : Seulontatesti: adsorptiokinetiikka tutkitaan viidessä erilaisessa maalajissa yhdellä pitoisuudella ja määritetään jakautumiskertoimet K_d ja K_{OC}.

Taso 3 : Freundlichin adsorptioisotermien määritys, jotta voidaan määrittää pitoisuuden vaikutus maa-aineksiin tapahtuvan adsorption laajuuteen.

Desorptiokinetiikka ja Freundlichin desorptioisotermit (lisäys 1).

1.3 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Symboli	Määritelmä	Yksiköt
A_{t_i}	adsorboitumisprosentti ajanhetkellä t_i	%
A_{eq}	adsorboitumisprosentti adsorptiotasapainotilassa	%
$m_s^{ads}(t_i)$	maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa ajanhetkellä t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa aikavälillä Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa adsorptiotasapainossa	µg
m_0	testiaineen massa koeputkessa, adsorptiotestin alussa	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	testiaineen massa mitattuna v_a^A määräosassa ajanhetkellä t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	aineen massa liuoksessa adsorptiotasapainotilassa	µg
m_{soil}	maa-ainesfaasin määrä, maa-aineksen kuiva-aineena ilmaistuna	g

▼B

Symboli	Määritelmä	Yksiköt
C_{st}	aineen varastoliuoksen massakonsentraatio	µg cm^{-3}
C_o	maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiliuoksen massakonsentraatio alussa	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	aineen massakonsentraatio vesifaasissa analyysin suorituksen ajanhetkellä t_i	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	maa-ainekseen adsorboituneen aineen konsentraatio adsorptiotasapainotilassa	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	aineen massakonsentraatio vesifaasissa adsorptiotasapainotilassa	µg cm^{-3}
V_0	adsorptiotestin aikana maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin alkutilavuus	cm^3
v_a^A	määräosan tilavuus, jossa testiaine mitataan	cm^3
K_d	jakautumiskerroin adsorptiolle	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	orgaanisen hiilen suhteen normalisoitu adsorptiokerroin	cm^3 g^{-1}
K_{om}	orgaanisen aineksen suhteen normalisoitu jakautumiskerroin	cm^3 g^1
K_F^{ads}	Freundlichin adsorptiokerroin	
l/n	Freundlichin eksponentti	
D_{t_i}	desorboitumisprosentti ajanhetkellä t_1	%
$D_{\Delta t_i}$	desorboitumisprosentti aikavälillä Δt_i	%
K_{des}	näennäinen desorptiokerroin	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Freundlichin desorptiokerroin	
$m_{aq}^{des}(t_i)$	maa-aineksesta desorboituneen testiaineen massa ajanhetkellä t_1	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	maa-aineksesta desorboituneen testiaineen massa aikavälillä Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	analyyttisesti määritetyn aineen massa vesifaasissa desorptiotasapainotilassa	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	desorboituneen testiaineen kokonaismassa desorptiotasapainotilassa	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen aineen massa aikavälin Δt_i jälkeen	µg
m_{aq}^{A}	epätäydellisestä tilavuustäydennyksestä johtuen adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jääneen aineen massa	µg
$C_s^{des}(eq)$	maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen testiaineen pitoisuus desorptiotasapainotilassa	µg g^{-1}

▼B

Symboli	Määritelmä	Yksiköt
$C_{aq}^{des}(eq)$	testiaineen massakonsentraatio vesifaasissa desorptiotasapainotilassa	µg cm^{-3}
V_T	maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus sarjamenetelmällä suoritettavan desorptiokinetiikkakokeen aikana	cm^3
V_R	adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen koeputkesta poistetun supernatantin tilavuus, joka korvataan samalla tilavuudella 0,01 M $CaCl_2$-liuosta	cm^3
v_a^D	koeputkesta (i) analyysitarkoituksiin otetun määräosan tilavuus sarjamenetelmällä suoritettavan desorptiokinetiikkakokeen aikana	cm^3
$V_{ra}{}^{iD}$	koeputkesta (i) testiaineen mittaamiseksi otetun liuoksen tilavuus desorptiokinetiikkakokeessa (rinnakkaismenetelmä)	cm^3
V_r^F	koeputkesta testiaineen mittaamiseksi otetun liuoksen tilavuus desorptiotasapainotilassa	cm^3
MB	massatase	%
m_E	maa-aineksesta ja koeastiaseinämistä kahdessa vaiheessa uutetun testiaineen kokonaismassa	µg
V_{rec}	adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen talteen otetun supernatantin tilavuus	cm^3
P_{ow}	oktanol-vesijakautumiskerroin	
pKa	hajoamisvakio	
S_w	vesiliukoisuus	g'''^1

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tunnetut tilavuudet testiaineliuoksia, merkitsemättöminä tai radioaktiivisesti merkittyinä, tunnettuina pitoisuuksina 0,01 M $CaCl_2$:ssa lisätään kuivapainoltaan tunnettuihin maa-ainesnäytteisiin, jotka on esitasapainotettu 0,01 M $CaCl_2$:ssa. Seosta ravistellaan riittävästi. Maa-ainessuspensiot sentrifugoidaan, suodatetaan haluttaessa ja vesifaasi analysoidaan. Maa-ainesnäytteeseen adsorboituneen testiaineen määrä lasketaan liuoksessa alussa olleen testiaineen määrän ja kokeen lopussa jäljellä olevan määrän välisenä erotuksena (epäsuora menetelmä).

Vaihtoehtoisesti adsorboituneen testiaineen määrä voidaan määrittää myös suoraan maa-ainesanalyysin avulla (suora menetelmä). Tätä menettelytapaa, johon kuuluu asteittainen maa-aineksen uutto sopivalla liuottimella, suositellaan silloin, kun aineen liuoskonsentraatioeroja ei voida täsmällisesti määrittää. Esimerkkejä tällaisista tapauksista ovat testiaineen adsorboituminen koeastioiden pintaan, testiaineen epästabiilius kokeen aikana, heikko adsorptio, mikä aiheuttaa vain pienen konsentraatiomuutoksen liuoksessa, sekä voimakas adsorptio, mikä saa aikaan alhaisen konsentraation, jota ei voida täsmällisesti määrittää, jos käytetään radioaktiivisesti merkittyä ainetta, maa-aineksen uutto voidaan välttää suorittamalla maa-ainesfaasin analyysi polttoa ja nestetuikelaskentaa käyttäen. Nestetuikelaskenta on kuitenkin epäspesifinen tekniikka, jolla ei voida erottaa lähtöaineita ja muunnostuotteita; siksi sitä olisi käytettävä ainoastaan silloin, kun testikemikaali on stabiili koko tutkimuksen keston ajan.

▼B

1.5 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Kemiallisten reagenssien on oltava analyysilaatua. Suositellaan merkitsemättömien, koostumukseltaan tunnettujen ja mieluiten puhtaudeltaan vähintään 95-prosenttisten testiaineiden käyttöä tai koostumukseltaan ja radio-isotooppipuhtaudeltaan tunnettujen radioaktiivisesti merkittyjen testiaineiden käyttöä. Jos merkkiaineiden puoliintumisajat ovat lyhyitä, on tehtävä hajoamiskorjauksia.

Testiaineesta on oltava seuraavat tiedot ennen adsorptio-desorptiotestin suorittamista:

a) vesiliukoisuus (A.6);

b) höyrynpaine (A.4) ja/tai Henryn lain vakio;

c) abioottinen hajoaminen: hydrolyysi pH:n funktiona (C.7);

d) jakautumiskerroin (A.8);

e) biologinen hajoavuus (C.4) tai aerobinen ja anaerobinen muuntuminen maa-aineksessa;

f) ionisoituvien aineiden pKa;

g) suora fotolyysi vedessä (eli UV-Vis-absorptiospektri vedessä, kvanttisaanto) ja fotohajoaminen maa-aineksessa.

1.6 TESTIN SOVELTUVUUS

Testi soveltuu kemiallisille aineille, joille on olemassa analyysimenetelmä, jota voidaan soveltaa riittävällä tarkkuudella. Tärkeä muuttuja, joka voi vaikuttaa tulosten luotettavuuteen, erityisesti epäsuoraa menetelmää käytettäessä, on testiaineen stabiilius testin aikana. Siksi edellytyksenä on tarkistaa stabiilius alustavassa tutkimuksessa; jos testin aikana havaitaan muuttumista, suositellaan, että varsinainen tutkimus suoritetaan analysoimalla sekä maa-aines- että vesifaasi.

Tätä testiä suoritettaessa ongelmia saattavat aiheuttaa testiaineet, joiden vesiliukoisuus on alhainen ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), tai paljon varauksia sisältävät aineet. Vaikeudet johtuvat siitä, että konsentraatiota vesifaasissa ei voida tällöin mitata analyyttisesti riittävällä tarkkuudella. Näissä tapauksissa tarvitaan lisävaiheita. Ohjeita näiden ongelmien ratkaisemiseksi annetaan tätä menetelmää koskevissa kappaleissa.

Kun testataan haihtuvia aineita, on huolehdittava siitä, ettei käsittelyn aikana tapahdu häviöitä.

1.7 MENETELMÄN KUVAUS

1.7.1 **Laitteet ja kemialliset reagenssit**

Standardi laboratoriolaitteisto, erityisesti seuraavat:

a) Koeputket tai astiat kokeiden suorittamiseksi. On tärkeää, että nämä koeputket tai astiat

— sopivat suoraan sentrifugiin aineiden käsittelystä ja siirtämisestä johtuvien virheiden minimoimiseksi,

— ovat inertistä materiaalista, mikä minimoi testiaineen adsorboitumisen niiden pinnalle.

▼B

b) Ravistelulaite: kääntelevä ravistelija tai vastaava laitteisto; ravistelulaitteen on pidettävä maa-aines suspensiona sekoituksen aikana.

c) Sentrifugi: mieluiten suurinopeuksinen, esimerkiksi keskipakovoima > 3 000 g, lämpötilaltaan säädettävä, pystyy erottelemaan halkaisijaltaan yli 0,2 μm olevat partikkelit vesiliuoksesta. Säiliöt on pidettävä suljettuina ravistelun ja sentrifugoinnin aikana haihtuvuus- ja vesihäviöiden välttämiseksi. Korkkeihin kohdistuvan adsorboitumisen minimoimiseksi on käytettävä deaktivoituja korkkeja, kuten teflonpäällysteisiä kierrekorkkeja.

d) Valinnainen: suodatuslaite; huokoisuudeltaan 0,2 μm:n steriilit kertakäyttösuodattimet. Suodatinmateriaalin valintaan on kiinnitettävä erityistä huomiota, jotta testiaine ci tartu siihen; orgaanista suodatinmateriaalia ei suositella niukkaliukoisille testiaineille.

e) Analyysivälineet, jotka soveltuvat testikemikaalin konsentraation mittaamiseen.

f) Laboratoriouuni, joka voidaan pitää lämpötilassa 103-110 °C.

1.7.2 **Maa-ainesten luonnehdinta ja valinta**

Maa-aineksista on määritettävä kolme ominaisuutta, joiden katsotaan pääasiassa vaikuttavan adsorptiokykyyn. Nämä ovat orgaaninen hiili, savipitoisuus ja maaperän rakenne sekä pH. Kuten jo mainittiin (katso soveltamisala}, muutkin maa-aineksen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet voivat vaikuttaa tietyn aineen adsorptioon ja desorptioon, ja ne täytyy ottaa huomioon kyseisissä tapauksissa.

Maa-aineksen luonnehdinnassa käytettävät menetelmät ovat hyvin tärkeitä, ja niillä voi olla merkittävä vaikutus tuloksiin. Siksi suositellaan, että maa-aineksen pH mitataan 0,01 M $CaCl_2$-liuoksessa (liuos, jota käytetään adsorptio/desorptiotestissä) ISO-menetelmän 10390-1 mukaisesti). Myös muita tärkeitä maa-aineksen ominaisuuksia suositellaan määritettäväksi standardimenetelmien mukaisesti (ISO Handbook of soil analysis). Tällöin sorptiotietojen analysointi voi perustua yleisesti standardoituihin maa-ainesta koskeviin muuttujiin. Joitakin käytössä olevien maa-aineksen analysointia ja luonnehdintaa koskevien standardimenetelmien ohjeita löytyy lähteistä 50-52. Maa-aineksen testimenetelmien kalibrointiin suositellaan vertailumaa-ainesten käyttöä.

Ohjeita maa-ainesten valitsemiseksi adsorptio/desorptiokokeisiin annetaan taulukossa 1. Seitsemän valittua maa-ainesta kattaa lauhkeilla maantieteellisillä alueilla esiintyvät maalajit. Ionisoituvien testiaineiden ollessa kyseessä valittujen maa-ainesten olisi katettava laaja pH-alue, jotta aineen adsorboituminen ionisoituneessa ja ionisoitumattomassa muodossa voidaan arvioida. Ohjeita siitä, kuinka montaa erilaista maa-ainesta käytetään testin eri vaiheissa, annetaan 1.9 kohdassa ”Testin suorittaminen”.

Jos muita maalajeja pidetään edellä mainittuja soveltuvampina, niistä on määritettävä samat muuttujat ja niillä on oltava erilaisia ominaisuuksia samalla tavoin kuin taulukossa 1 on esitetty, vaikka ne eivät täyttäisikään täsmälleen perusteita.

▼B

Taulukko 1

Ohjeet maa-ainesnäytteiden valitsemiseksi adsorptio-desorptiokokeisiin

Maalaji	pH-alue (0,01 M $CaCl_2$:ssa)	Orgaanisen hiilen pitoisuus (%)	Savipitoisuus (%)	Maaperän rakenne ([1])
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65-80	savi
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20-40	hiuesavi
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15-25	hiesusavi
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15-30	savikko
5	< 4,0 - 6,0 ([2])	< 0,5 - 1,5 ([2]) ([3])	< 10-15 ([2])	savinen hiekka
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 ([2]) ([3])	40-65	hiuesavi/savi
7	< 4,5	> 10	< 10	hiekka / savinen hiekka

([1]) FAO- ja US-järjestelmän mukaisesti (85).
([2]) Vastaavien muuttuja-arvojen olisi mieluiten oltava annetulla alueella. Jos sopivan maa-ainesmateriaalin löytämisessä kuitenkin ilmenee vaikeuksia, annettujen vähimmäisarvojen alapuolelle jäävät arvot hyväksytään.
([3]) Maa-ainekset, joiden orgaanisen hiilen pitoisuus on alle 0,3 %, voivat häiritä orgaanisen aineen pitoisuuden ja adsorption välistä korrelaatiota. Siksi suositellaan käytettäväksi maa-aineksia, joiden orgaanisen hiilen vähimmäispitoisuus on 0,3 %.

1.7.3 **Maa-ainesnäytteiden kerääminen ja säilytys**

1.7.3.1 *Kerääminen*

Mitään erityistä näytteenottotekniikkaa tai -välineitä ei suositella; näytteenottotekniikka määräytyy tutkimuksen tarkoituksen mukaisesti (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Seuraavat seikat on otettava huomioon:

a) yksityiskohtaiset tiedot kenttäalueen sijainnista, kasvillisuudesta ja aiemmasta käytöstä (torjunta-aine- ja/tai lannoitekäsittelyt, biologiset lisäykset) tai tahattomasta kontaminaatiosta ovat välttämättömät. Maa-ainesten näytteenotossa olisi noudatettava näytteenottopaikan kuvausta koskevia ISO-standardin 10381-6 suosituksia;

b) näytteenottopaikka on määriteltävä UTM:n (Universal Transversal Mercator –projektio / European Horizontal Datum) mukaisesti tai maantieteellisten koordinaattien mukaisesti; näin tietyn maa-aineksen uudelleen kerääminen myöhemmin on mahdollista tai tästä voi olla apua määriteltäessä maa-aineksia eri maissa käytettyjen erilaisten luokitusjärjestelmien mukaisesti. Lisäksi A-kerroksesta olisi kerättävä ainoastaan enintään 20 cm:n syvyydeltä. Erityisesti maalajista nro 7 on otettava näyte O_h-kerroksesta, jos sitä esiintyy maa-aineksen osana.

Maa-ainesnäytteet on kuljetettava sellaisissa säiliöissä ja lämpöolosuhteissa, jotka takaavat, etteivät alkuperäiset maa-aineksen ominaisuudet muutu merkittävästi.

▼B

1.7.3.2 *Säilytys*

Käytetään mieluiten tuoreita kentältä otettuja maa-aineksia. Ainoastaan silloin, kun tämä ei ole mahdollista, maa-aines säilytetään huoneenlämpötilassa ja pidetään ilmakuivana. Mitään takarajaa säilytykselle ei suositella, mutta maa-ainekset, joita on säilytetty yli kolme vuotta, on analysoitava uudelleen ennen käyttöä niiden orgaanisen hiilen pitoisuuden, pH:n ja kationinvaihtokyvyn (CEC) osalta.

1.7.3.3 *Maa-ainesnäytteiden käsittely ja valmistelu testiä varten*

Maa-ainekset ilmakuivataan huoneenlämpötilassa (mieluiten lämpötilassa 20-25 °C). Kokonaisuuden pilkkominen on suoritettava mahdollisimman varovasti, jotta maaperän alkuperäinen rakenne muuttuisi mahdollisimman vähän. Maa-ainekset seulotaan partikkelikokoon < 2 mm; seulonnassa noudatetaan maa-ainesten näytteenottoa koskevia ISO-standardin suosituksia (ISO 10381-6). Huolellista homogenointia suositellaan sen vuoksi, että se parantaa tulosten uusittavuutta. Kunkin maa-aineksen kosteuspitoisuus määritetään kolmesta määräosasta kuumentamalla lämpötilassa 105 °C, kunnes painonmuutos ei ole merkittävä (noin 12 h). Kaikissa laskelmissa maa-aineksen massalla tarkoitetaan uunikuivaa massaa eli maa-aineksen kosteuspitoisuuskorjattua painoa.

1.7.4 **Testiaineen valmistus maa-ainekseen lisättäväksi**

Testiaine liuotetaan tislattuun tai deionisoituun veteen valmistettuun 0,01 M $CaCl_2$-liuokseen; $CaCl_2$-liuosta käytetään vesipitoisena liuotinfaasina parantamaan sentrifugointia ja minimoimaan kationinvaihtoa. Varastoliuoksen konsentraation on mieluiten oltava suuruusluokaltaan tuhatkertainen käytetyn analyysimenetelmän herkkyyteen verrattuna. Tällöin tällä menetelmällä saadaan tarkkoja mittauksia; lisäksi varastoliuoskonsentraation on oltava testiaineen vesiliukoisuusrajaa pienempi.

Varastoliuos valmistetaan mieluiten juuri ennen sen lisäämistä maa-ainesnäytteisiin, ja se säilytetään suljettuna pimeässä 4 °C:n lämpötilassa. Säilytysaika riippuu testiaineen stabiiliudesta ja sen konsentraatiosta liuoksessa.

Ainoastaan niukkaliukoisille aineille ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) saatetaan tarvita soveltuvaa liuottavaa ainetta silloin, kun testiaineen liuottaminen on vaikeaa. Tämän liuottavan aineen on sekoituttava veteen (esim. metanoli tai asetonitriili); sen konsentraatio ei saa ylittää yhtä prosenttia varastoliuoksen kokonaistilavuudesta ja sitä saa olla enintään tämän verran testiaineliuoksessa, joka joutuu kosketuksiin maa-aineksen kanssa (mieluiten alle 0,1 %). Se ei myöskään saa olla pinta-aktiivinen aine eikä se saa osallistua solvataatioreaktioihin testikemikaalin kanssa. Liuottavan aineen käytöstä on määrättävä ja sen käyttö on perusteltava tuloksia raportoitaessa.

Toisena vaihtoehtona on lisätä niukkaliukoinen testiaine koejärjestelmään siten, että testiaine liuotetaan orgaaniseen liuottimeen, ja määräosa tästä lisätään järjestelmään, jossa on maa-ainesta ja tislattuun tai deionisoituun veteen valmistettua 0,01 M $CaCl_2$-liuosta. Orgaanisen liuottimen pitoisuus vesifaasissa on pidettävä mahdollisimman alhaisena, tavallisesti alle 0,1 prosentin. Testiaineen lisäys orgaanisessa liuoksessa voi vaikuttaa virheellisesti tilavuusmäärän toistettavuuteen. Näin ollen lisävirhe on mahdollinen, kun testiaineen ja lisäliuottimen konsentraatiot eivät ole samat kaikissa testeissä.

▼B

1.8 EDELLYTYKSET ADSORPTIO-DESORPTIOTESTIN SUORITTAMISELLE

1.8.1 **Analyysimenetelmä**

Tärkeimmät tekijät, jotka voivat vaikuttaa sorptiomittausten tarkkuuteen, ovat sekä liuos- että adsorptiofaasien analyyseissä käytettävän analyyttisen menetelmän tarkkuus, testiaineen stabiilius ja puhtaus, sorptiotasapainotilan saavuttamisaste, liuoskonsentraatiomuutoksen suuruus, maa-aines/liuos-suhde sekä muutokset maa-aineksen rakenteessa tasapainoprosessin aikana (35) (59-62). Lisäyksessä 2 esitetään joitakin esimerkkejä tarkkuutta koskevista kysymyksistä.

Käytetyn analyysimenetelmän luotettavuus on tarkistettava sillä konsentraatioalueella, joka todennäköisesti esiintyy testin aikana. Kokeen suorittaja voi vapaasti kehittää soveltuvan menetelmän, jonka tarkkuus, täsmällisyys, uusittavuus, herkkyys ja saanto ovat tarkoituksenmukaisia. Ohjeita tällaisen testin suorittamiseksi saadaan jäljempänä esitettävästä kokeesta.

Sopivaa määrää 0,01 M $CaCl_2$-liuosta, esimerkiksi 100 cm^3, ravistellaan 4 tunnin ajan yhdessä maa-ainesmäärän kanssa, esimerkiksi 20 g, jonka adsorptiokyky on hyvä, eli jonka orgaanisen hiilen pitoisuus ja savipitoisuus on korkea; nämä painot ja tilavuudet voivat vaihdella analyysitarpeiden mukaisesti. Sopivana lähtökohtana voidaan pitää maa-aines/liuos-suhdetta 1:5. Seos sentrifugoidaan ja vesifaasi voidaan suodattaa. Vesifaasiin lisätään tietty tilavuusmäärä testiaineen varastoliuosta, jotta saadaan nimellinen konsentraatio sille konsentraatioalueelle, joka todennäköisesti esiintyy testin aikana. Tämä tilavuusmäärä ei saa ylittää 10:tä prosenttia vesifaasin lopputilavuudesta — tällöin se muuttaa esitasapainotusliuoksen ominaisuuksia mahdollisimman vähän. Liuos analysoidaan.

Testaukseen on sisällytettävä yksi nollakoe, jossa on vain maa-aines ja $CaCl_2$-liuos (ilman testiainetta), jotta voidaan tarkistaa, johtuuko analyysimenetelmästä artefaktoja ja maa-aineksesta matriisivaikutuksia.

Analyysimenetelmät, joita voidaan käyttää sorptiomittauksiin, käsittävät kaasu-nestekromatografian (GLC), korkean suorituskyvyn nestekromatografian (HPLC), spektrofotometrian (esimerkiksi GC-massaspektrometria, HPLC-massaspektrometria) ja nestetuikelaskennan (vain radioaktiivisesti merkityille aineille). Käytetystä analyysimenetelmästä riippumatta pidetään sopivana, että saannot ovat 90-110 prosenttia nimellisarvosta. Jotta kromatografisen erotuksen jälkeen voidaan tulos detektoida ja arvioida, analyyttisen menetelmän herkkyyden olisi oltava suuruusluokaltaan nimelliskonsentraatiota vähintään kaksi kertaluokkaa pienempi.

Adsorptiotutkimuksiin käytettävän analyysimenetelmän ominaisuudet ja herkkyys ovat tärkeitä tekijöitä määriteltäessä koeolosuhteita ja testin koko suorituskykyä. Tässä menetelmässä noudatetaan yleisiä koekäytäntöjä ja annetaan suosituksia ja ohjeita vaihtoehtoisille ratkaisuille, jos analyysimenetelmä tai laboratoriomahdollisuudet asettavat rajoituksia.

▼B

1.8.2 **Optimaalisten maa-aines/liuos-suhteiden valinta**

Sopivien maa-aines/liuos-suhteiden valinta sorptiotutkimuksiin riippuu jakautumiskertoimesta K_d ja halutusta suhteellisesta adsorboitumisasteesta. Aineen konsentraationmuutos liuoksessa taas vaikuttaa adsorptioyhtälöön perustuvan mittauksen tilastolliseen tarkkuuteen ja on osoitus analyyttisen menetelmän herkkyydestä. Siksi käytännössä on hyödyllistä valita muutama kiinteä suhde, joilla adsorboitumisprosentti on yli 20 prosenttia ja mieluiten > 50 prosenttia (62); samalla on huolehdittava siitä, että testiaineen konsentraatio vesifaasissa on riittävän korkea tarkan mittauksen mahdollistamiseksi. Tämä on erityisen tärkeää silloin, kun adsorboitumisprosentit ovat suuria.

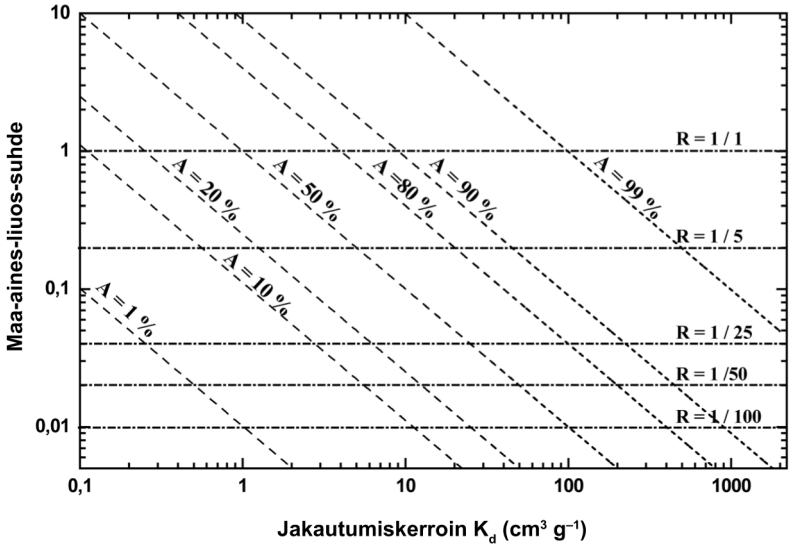
Sopiva lähestymistapa soveltuvien maa-aines/vesi-suhteiden valitsemiseksi perustuu joko alustavissa tutkimuksissa tai hyväksytyin arviointitekniikoin (lisäys 3) arvioituun K_d-arvoon. Soveltuvan suhteen valinta voidaan tehdä sitten K_d:n funktiona esitetyn maa-aines/liuos-suhdediagrammin pohjalta määrätyille adsorboitumisprosenteille (kuva 1). Esityksessä oletetaan, että adsorptioyhtälö on lineaarinen ([1]). Sopiva suhde saadaan järjestämällä K_d:n yhtälö (4) yhtälön (1) muotoon:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

tai sen logaritmiseen muotoon olettaen että $R = m_{soil}/V_0$ ja

$$A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)} \right] \qquad (2)$$



Kuva 1: Maa-aines-liuos-suhteiden ja K_d:n välinen yhteys testiaineen erilaisilla adsorboitumisprosenteilla.

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

Kuvassa 1 esitetään tarvittavat maa-aines/liuos-suhteet K_d:n funktiona eri adsorboitumisasteille. Esimerkiksi maa-aines/liuos-suhteen ollessa 1:5 ja K_d:n ollessa 20 adsorboituminen on 80 prosentin luokkaa. Jotta saavutettaisiin 50 prosentin adsorboituminen samalla K_d-arvolla, on käytettävä suhdetta 1:25. Tällainen lähestymistapa sopivan maa-aines/liuos-suhteiden valitsemisessa antaa tutkijalle joustavuutta.

Vaikeammin käsiteltäviä tapauksia ovat ne, joissa kemikaali on voimakkaasti tai hyvin heikosti adsorboitunut. Silloin kun adsorboituminen on heikkoa, suositellaan maa-aines/liuos-suhteeksi 1:1, vaikkakin eräille hyvin orgaanisille maalajeille saatetaan tarvita pienempiä suhteita lietteen saamiseksi. Pienten liuoskonsentraatiomuutosten mittaamiseksi käytettävien analyysimenetelmien kanssa on oltava huolellinen: muutoin adsorptiomittaukset ovat epätarkkoja. Toisaalta K_d-jakautumiskertoimien ollessa hyvin suuria saatetaan maa-aines/-liuos-suhteissa mennä jopa suhteisiin 1:100, jotta liuokseen jäisi merkittävä määrä kemikaalia. Huolellisuutta on kuitenkin noudatettava hyvän sekoituksen varmistamiseksi ja systeemin tasapainottumiseen on jätettävä riittävästi aikaa. Vaihtoehtoisena lähestymistapana on ennustaa K_d-arvo arviointitekniikkoja käyttäen, esimerkiksi P_{ow}-arvoihin (lisäys 3) perustuvaa tekniikkaa käyttäen. Tämä voi olla hyödyllistä erityisesti heikosti adsorboituville/polaarisille kemikaaleille, joiden $P_{ow} < 20$, ja lipofiilisille tai helposti sorboituville kemikaaleille, joiden $P_{ow} > 10^4$.

1.9 TESTIN SUORITTAMINEN

1.9.1 **Koeolosuhteet**

Kaikki kokeet suoritetaan huoneenlämpötilassa ja vakiolämpötilassa 20-25 ºC, jos mahdollista.

Sentrifugoinnilla olisi voitava erottaa liuoksesta yli 0,2 μm:n kokoiset partikkelit. Tätä pidetään kiintoainepartikkelin ja kolloidipartikkelin raja-arvona. Ohjeita sentrifugointiolosuhteiden määrittelemiseksi annetaan lisäyksessä 4.

Jos sentrifugoinnilla ei voida poistaa yli 0,2 μm:n kokoisia partikkeleita, voidaan käyttää sentrifugoinnin ja yli 0,2 μm:n suodattimilla suoritettavan suodatuksen yhdistelmää. Näiden suodattimien on oltava sopivaa inerttiä materiaalia, jotta niiden pinnalle takertumisesta aiheutuvat testiaineen häviöt voitaisiin välttää. Joka tapauksessa on osoitettava, ettei suodatuksen aikana tapahdu testiainehäviöitä.

1.9.2 **Taso 1 — Alustava tutkimus**

Alustavan tutkimuksen tarkoitus on selvitetty jo kohdassa ”Soveltamisala”. Ohjeita kyseisen tutkimuksen toteuttamiseksi annetaan jäljempänä esitettävässä kokeessa.

1.9.2.1 *Optimaalisten maa-aines/liuos-suhteiden valitseminen*

Käytetään kahta maalajia ja kolmea maa-aines/liuos-suhdetta (kuusi koetta). Toisessa maalajissa orgaanisen hiilen pitoisuus on korkea ja savipitoisuus matala, ja toisessa maalajissa orgaanisen hiilen pitoisuus on matala ja savipitoisuus korkea. Suositellaan seuraavia suhteita:

— 50 g maa-ainesta ja 50 cm^3 testiaineen vesiliuosta (suhde 1/1),

▼B

— 10 g maa-ainesta ja 50 cm^3 testiaineen vesiliuosta (suhde 1/5),

— 2 g maa-ainesta ja 50 cm^3 testiaineen vesiliuosta (suhde 1/25).

Vähimmäismäärä maa-ainesta, jolla koe voidaan suorittaa, riippuu laboratoriomahdollisuuksista ja käytettyjen analyysimenetelmien suorituskyvystä. Käytettäväksi suositellaan kuitenkin vähintään 1:tä grammaa ja mieluiten 2:ta grammaa maa-ainesta luotettavien testitulosten saamiseksi.

Yhdelle vertailunäytteelle. jossa on ainoastaan testiainetta 0,01 M $CaCl_2$-liuoksessa (ei maa-ainesta), suoritetaan täsmälleen samat toimenpiteet kuin testisysteemeille, jotta testiaineen stabiilius $CaCl_2$-liuoksessa ja sen mahdollinen adsorboituminen koeastioiden pinnalle voidaan tarkistaa.

Nollakokeella, jossa on sama määrä maa-ainesta ja liuoksen kokonaistilavuus 50 $cm^3$0,01 M $CaCl_2$-liuosta (ilman testiainetta), suoritetaan samat testaustoimenpiteet kutakin maa-ainesta kohden. Tämä toimii taustavertailuna analyysin aikana häiritsevien aineiden tai kontaminoituneiden maa-ainesten havaitsemiseksi.

Kaikki kokeet, vertailu- ja nollakokeet mukaan lukien, suoritetaan vähintään rinnakkaisnäytteillä. Tutkimusta varten valmistettavien näytteiden kokonaismäärä voidaan laskea käytettävän menetelmän mukaisesti.

Alustava tutkimus ja varsinainen tutkimus tehdään yleisesti ottaen samoilla menetelmillä. Poikkeuksista mainitaan tarvittaessa.

Ilmakuivatut maa-ainesnäytteet saatetaan tasapainoon ravistelemalla niitä vähintään 45 cm^3:n kanssa 0,01 M $CaCl_2$-liuosta yön yli (12 h) ennen koepäivää. Myöhemmin lisätään tietty tilavuusmäärä testiaineen varastoliuosta, jotta lopputilavuudeksi saadaan 50 cm^3. Tämän lisättävän varastoliuoksen tilavuus ei saa ylittää 10:tä prosenttia vesifaasin lopputilavuudesta (50 cm^3), jotta esitasapainotusliuoksen ominaisuudet muuttuisivat mahdollisimman vähän, ja sen olisi mieluiten oltava sellainen, että maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiaineen alkukonsentraatio C_0 on suuruusluokaltaan vähintään satakertainen analyysimenetelmän herkkyyteen verrattuna; tällainen konsentraatio takaa tarkkojen mittausten suorittamisen myös silloin, kun adsorptio on voimakas (> 90 %) ja sen, että adsorptioisotermit voidaan myöhemmin määrittää. Suositellaan myös, jos mahdollista, ettei aineen alkukonsentraatio (C_0) ylittäisi puolta siitä, mikä on sen liukoisuusraja.

Jäljempänä esitetään esimerkki siitä, kuinka varastoliuoksen konsentraatio (C_{st}) lasketaan. Oletetaan, että toteamisraja on 0,01 µg cm^{-3} ja adsorptio 90 prosenttia; tällöin maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiaineen alkukonsentraation olisi mieluiten oltava 1 µg cm^{-3} (suuruusluokaltaan satakertainen toteamisrajaan verrattuna). Oletetaan, että varastoliuosta lisätään suositeltu enimmäismäärä eli 5 cm^3 45 cm^3:iin 0,01 M $CaCl_2$-tasapainoliuosta (= varastoliuos 10 % vesifaasin 50 cm^3:n kokonaistilavuudesta), jolloin varastoliuoksen konsentraation on oltava 10 µg cm^{-3}; tämä on suuruusluokaltaan tuhatkertainen analyysimenetelmän toteamisrajaan verrattuna.

Vesifaasin pH on mitattava ennen ja jälkeen maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutumista, koska tällä on tärkeä merkitys koko adsorptioprosessissa, erityisesti ionisoituvien aineiden ollessa kyseessä.

▼B

Seosta ravistellaan, kunnes adsorptiotasapainotila on saavutettu. Aika tasapainotilan saavuttamiseksi maa-aineksissa vaihtelee suuresti kemikaalin ja maa-aineksen mukaisesti; 24 tunnin jakso on yleensä riittävä (77). Alustavassa tutkimuksessa näytteitä voidaan kerätä järjestyksessä 48 tunnin sekoitusjakson aikana (esimerkiksi 4, 8, 24, 48 tunnin kohdalla). Analyysiajat on kuitenkin sovitettava joustavasti laboratorion työaikataluluun.

Testiaineen vesiliuoksen analysoimiseksi on kaksi vaihtoehtoa: a) rinnakkaismenetelmä ja b) sarjamenetelmä. On korostettava sitä, että vaikka rinnakkaismenetelmä vie kokeellisesti enemmän aikaa, tulosten matemaattinen käsittely on yksinkertaisempaa (liite 5). Käytettävän menetelmän valitsee kuitenkin kokeen suorittaja, jonka on otettava huomioon käytettävissä olevat mahdollisuudet ja resurssit laboratoriossa.

a) Rinnakkaismenetelmä: valmistetaan samalla maa-aines/liuos-suhteella niin monta näytettä kuin adsorptiokinetiikan tutkimiseksi halutaan näytteenottohetkiä. Sentrifugoinnin ja mahdollisen suodatuksen jälkeen ensimmäisen koeputken vesifaasi otetaan talteen mahdollisimman tarkasti ja mitataan esimerkiksi 4 tunnin jälkeen, vastaavasti toiselle koeputkelle 8 tunnin, kolmannelle koeputkelle 24 tunnin jälkeen ja niin edelleen.

b) Sarjamenetelmä: kullekin maa-aines/liuos-suhteelle valmistetaan ainoastaan yksi kaksoisnäyte. Tietyin aikavälein seos sentrifugoidaan faasien erottamiseksi. Vesifaasista otetaan pieni määräosa, josta testiaine analysoidaan välittömästi: koe jatkuu sitten alkuperäisellä seoksella. Jos käytetään suodatusta sentrifugoinnin jälkeen, laboratoriossa olisi oltava mahdollisuudet pienten vesipitoisten määräosien suodatuskäsittelyyn. Suositellaan, että otettujen määräosien kokonaismäärä ei ylitä yhtä prosenttia liuoksen kokonaistilavuudesta. Tämä siksi, ettei maa-aines/liuos-suhde muuttuisi merkittävästi ja ettei testin aikana adsorboituvissa olevan liukoisen massan määrä myöskään vähenisi.

Adsorboitumisprosentti, lasketaan kullakin ajanhetkellä (A_{t_i}) nimellisen alkukonsentraation pohjalta ja näytteenottohetkellä (A_{t_i}) mitattu konsentraatio korjataan nollakoearvon perusteella. Ajan funktiona esitettäviä käyriä (kuva 1, liite 5) käytetään tasapainotilan saavuttamisen arvioimiseksi ([1]). Lasketaan myös K_d-arvo tasapainotilassa. Tämän K_d-arvon pohjalta valitaan kuvasta 1 sopivat maa-aines/-liuos-suhteet siten, että adsorboitumisprosentti on yli 20 prosenttia, mieluiten > 50 prosenttia (61). Kaikki diagrammeissa käytettävät yhtälöt ja periaatteet esitetään kohdassa ”Tulokset ja niiden raportointi” sekä lisäyksessä 5.

1.9.2.2 *Adsorptiotasapainotilan saavuttamisajan määrittäminen ja adsorboituneen testiaineen määrittäminen tasapainotilassa*

Kuten jo mainittiin, ajan funktiona esitettävien A_{t_i} tai C_{aq}^{ads} -käyrien avulla on mahdollista arvioida adsorptiotasapainotilan saavuttamista ja adsorboituneen testiaineen määrää tasapainotilassa. Lisäyksessä 5 esitetyissä kuvissa 1 ja 2 on esimerkkejä tällaisista käyristä. Tasapainottumisaika on se aika, jonka systeemi tarvitsee tasapainon saavuttamiseen.

([1]) Vesifaasissa olevan testiaineen konsentraatiota C_{aq}^{ads} ajan funktiona kuvaavia diagrammeja voidaan käyttää myös tasapainotilan saavuttamisen arviointiin (katso kuva 2 lisäyksessä 5).

▼B

Jos jotain tiettyä maa-ainesta tutkittaessa tasapainotilaa ei saavuteta, vaan konsentraatio nousee jatkuvasti, tämä voi johtua sekoittavista tekijöistä kuten biohajoamisesta tai hitaasta diffuusiosta. Biohajoaminen voidaan osoittaa toistamalla koe steriloitua maa-ainesnäytettä käyttäen. Jos tasapainotilaa ei tällöinkään saavuteta, kokeen suorittajan on etsittävä muita ilmiöitä, jotka saattaisivat liittyä kyseisiin tutkimuksiin: tämä voidaan tehdä muuntelemalla koeolosuhteita sopivasti (lämpötila, ravisteluajat, maa-aines/liuos-suhteet). Kokeen suorittajan päätettävissä on, jatkaako hän testin suoritusta, vaikka tasapainotila saattaa jäädä saavuttamatta.

1.9.2.3 *Adsorptio koeastian pintaan ja testiaineen stabiilius*

Joitakin tietoja testiaineen adsorboitumisesta koeastioiden pintaan samoin kuin sen stabiiliudesta voidaan johtaa vertailunäytteiden analysoinnista. Jos havaitaan konsentraation pienenevän enemmän kuin analyysimenetelmän keskivirhe, kyseessä saattaa olla abioottinen hajoaminen ja/tai adsorptio koeastian pintaan. Nämä ilmiöt voidaan erottaa toisistaan siten, että astian seinämät huuhdellaan huolellisesti tunnetulla määrällä sopivaa liuotinta ja analysoidaan pesuliuos testiaineen osalta. Jos adsorptiota koeastioiden pintaan ei havaita, vähennys osoittaa testiaineen abioottista epästabiiliutta. Jos adsorboitumista havaitaan, koeastiamateriaali on vaihdettava. Tästä kokeesta saatuja tietoja koeastioiden pintaan tapahtuvasta adsorboitumisesta ei voida kuitenkaan ekstrapoloida suoraan maa-aines/liuos-kokeeseen. Maa-aineksen läsnäolo vaikuttaa tähän adsorboitumiseen.

Lisätietoja testiaineen stabiiliudesta voidaan johtaa määrittämällä kokonaismassatase kokeen aikana. Tämä tarkoittaa sitä, että testiaine määritetään vesifaasista, maa-ainesuutteista ja koeastian seinämistä. Lisätyn testikemikaalin massan ja vesifaasissa olevien testikemikaalimassojen ja maa-aineksesta sekä koeastiaseinämistä saatujen uutteiden summan välinen ero on yhtä kuin hajonnut ja/tai haihtunut ja/tai uuttumaton massa. Massataseen määrittämiseksi adsorptiotasapainotila on saavutettava koejakson aikana.

Massatase määritetään sekä maa-aineksesta että yhdestä sellaisesta maa-aines/liuos-suhteesta maa-ainesta kohden, josta vähenee yli 20 prosenttia ja mieluiten > 50 prosenttia tasapainotilassa. Kun suhteenmäärityskokeen lopussa on viimeinen näyte vesifaasista määritetty 48 tunnin jälkeen, faasit erotetaan sentrifugoimalla, ja mahdollisesti suodattamalla. Vesifaasi otetaan talteen mahdollisimman tarkasti, ja sopivaa uuttoliuotinta (uuttokerroin vähintään 95 %) lisätään maa-ainekseen testiaineen uuttamiseksi. Suositellaan vähintään kahta peräkkäistä uuttoa. Testiaine määritetään maa-aines- ja koeastiauutteista ja lasketaan massatase (yhtälö 10, ”Tiedot ja raportointi”). Jos se on alle 90 prosenttia, katsotaan, että testiaine on epästabiili testin aikana. Tutkimukset voivat kuitenkin yhä jatkua, kunhan testiaineen epästabiilius otetaan huomioon; tässä tapauksessa varsinaiseen tutkimukseen suositellaan molempien faasien analysointia.

▼B

1.9.2.4 *Taso 2 — Adsorptiokinetiikka yhdellä testiainekonsentraatiolla*

Käytetään viittä maa-ainesta, jotka valitaan taulukosta 1. Näihin viiteen maa-ainekseen olisi hyvä sisällyttää kaikki alustavassa tutkimuksessa käytetyt maa-ainekset tai joitakin niistä. Tällöin tasoa 2 ei tarvitse toistaa alustavassa tutkimuksessa käytetyille maa-aineksille.

Tasapainotilan saavuttamisaika, maa-aines/liuos-suhde, maa-ainesnäytteen paino, maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin tilavuus ja testiaineen konsentraatio liuoksessa valitaan alustavan tutkimuksen tulosten perusteella. Analyysi on suoritettava mieluiten noin 2, 4, 6, 8 (mahdollisesti myös 10) ja 24 tunnin kontaktiajan jälkeen; ravisteluaika voidaan ulottaa enintään 48 tuntiin silloin, kun kemikaali tarvitsee pidemmän ajan tasapainotilan saavuttamiseen suhteenmääritystulosten perusteella. Analyysiaikoihin voidaan kuitenkin suhtautua joustavasti.

Jokainen koe (yksi maa-aines ja yksi liuos) suoritetaan vähintään rinnakkaisnäytteillä tulosten varianssin arvioimiseksi. Jokaisessa kokeessa suoritetaan yksi nollakoe. Siinä käytetään maa-ainesta ja 0,01 M $CaCl_2$-liuosta ilman testiainetta, ja painon ja tilavuuden on oltava samat kuin varsinaisessa kokeessa. Vertailunäytteelle, jossa on ainoastaan testiainetta 0,01 M $CaCl_2$-liuoksessa (ilman maa-ainesta), suoritetaan sama testimenettely, jotta voitaisiin varautua yllättäviin tilanteisiin.

Adsorboitumisprosentti lasketaan kullakin ajanhetkellä, A_{t_i} ja/tai aikavälillä $A_{\Delta t_i}$ (tarpeen mukaan) ja esitetään ajan funktiona. Lasketaan myös jakautumiskerroin K_d tasapainotilassa samoin kuin orgaanisen hiilen suhteen normalisoitu adsorptiokerroin K_{oc}. (ei-polaarisille orgaanisille kemikaaleille).

Adsorptiokinetiikkatestin tulokset

Lineaarinen K_d-arvo on yleensä tarkka kuvaamaan sorptiokäyttäytymistä maa-aineksessa (35) (78) ja se kuvaa kemikaalien luontaista kulkeutumista maaperässä. Esimerkiksi kemikaaleja, joiden $K_d \leq 1\ cm^3\ g^{-1}$, pidetään yleensä helposti kulkeutuvina. MacCall et al. (16) ovat kehittäneet K_{oc}-arvoihin perustuvan kulkeutuvuusluokituskaavion. Lisäksi käytetään K_{oc}:n ja DT-50[6]:n väliseen suhteeseen ([1]) (32) (79) perustuvia uuttumisluokituskaavioita.

Virheanalyysitutkimusten mukaan (61) alle 0,3 $cm^3\ g^{-1}$ olevia K_d-arvoja ei myöskään voida arvioida tarkasti vesifaasikonsentraation pienenemisen pohjalta, ei edes silloin, kun käytetään soveltuvinta (tarkkuuden kannalta soveltuvinta) maa-aines/liuos-suhdetta, eli 1:1. Tällaisessa tapauksessa suositellaan molempien faasien, sekä maa-aineksen että liuoksen, analysointia.

([1]) DT-50: aika, jolloin 50 % testiaineesta on hajonnut.

▼B

Edellä esitettyjen huomautusten pohjalta suositellaan, että kemikaalin adsorptiokäyttäytymistä ja mahdollista kulkeutumista maaperässä koskevaa tutkimusta jatketaan määrittämällä Freundlichin adsorptioisotermit näille systeemeille. K_d:n tarkka määrittäminen kyseisille systeemeille on mahdollista tässä testimenetelmässä esitettävän koejärjestelyn avulla. Täsmällinen määritys on mahdollinen, jos K_d kerrottuna maa-aines/liuos-suhteella antaa tulokseksi arvon > 0.3 silloin, kun mittaukset perustuvat vesifaasikonsentraation pienenemiseen (epäsuora menetelmä), tai arvon > 0,1 silloin, kun molemmat faasit analysoidaan (suora menetelmä) (61).

1.9.2.5 *Taso 3 — Adsorptioisotermit ja desorptiokinetiikka/-desorptioisotermit*

1.9.2.5.1 A d s o r p t i o i s o t e r m i t

Käytetään viittä testiainekonsentraatiota, jotka kattavat mieluiten kaksi suuruusluokkaa; näitä konsentraatioita valittaessa on otettava huomioon vesiliukoisuus ja syntyvät tasapainokonsentraatiot vesiliuoksissa. Kullakin maa-aineksella on säilytettävä sama maa-aines/-liuos-suhde läpi tutkimuksen. Adsorptiotesti suoritetaan edellä kuvatulla tavalla lukuun ottamatta sitä, että vesifaasi analysoidaan vain kerran ja sillä ajanhetkellä, joka tarvitaan tasapainotilan saavuttamiseen (ja joka määritettiin edellä 2-tason kokeessa). Liuoksen tasapainokonsentraatiot määritetään ja adsorboitunut määrä lasketaan testiaineen vähentymisestä liuoksesta tai suoraa menetelmää käyttäen. Adsorboitunut massa maa-aineksen massayksikköä kohden esitetään testiaineen tasapainokonsentraation funktiona (katso ”Tulokset ja niiden raportointi”).

Adsorptioisotermikokeen tulokset

Tähän mennessä esitetyistä matemaattisista adsorptiomalleista Freundlichin isotermi on se, jota useimmin käytetään adsorptioprosessien kuvaamiseen. Yksityiskohtaisempia tietoja adsorptiomallien tulkinnasta ja merkityksestä esitetään lähteissä (41) (45) (80) (81) (82).

Huomautus: Eri aineiden K_F-arvojen (Freundlichin adsorptiokertoimien) vertailu on mahdollista ainoastaan silloin, kun nämä K_F-arvot ilmaistaan samoina yksikköinä (83).

1.9.2.5.2 D e s o r p t i o k i n e t i i k k a

Tämän kokeen tarkoituksena on tutkia, adsorboituuko kemikaali maa-ainekseen reversiibelisti vai irreversiibelisti. Tämä tieto on tärkeä, koska desorptioprosessilla on tärkeä merkitys myös kemikaalin käyttäytymisessä maaperässä kenttäolosuhteissa. Desorptiotiedot ovat lisäksi käyttökelpoisia syöttötietoja uuttumista kuvaavassa tietokonemallintamisessa ja liuenneita aineita sisältävien valumien simuloinnissa. Jos halutaan tehdä desorptiotutkimus, suositellaan, että jäljempänä kuvattava tutkimus suoritetaan jokaiselle systeemille, jolle edellisessä adsorptiokinetiikkakokeessa on ollut mahdollista määrittää tarkka K_d-arvo.

Kuten adsorptiokinetiikkatutkimuksessakin, desorptiokinetiikkakokeessa on käytettävissä kaksi vaihtoehtoa: a) rinnakkaismenetelmä ja b) sarjamenetelmä. Käytettävän menetelmän valitsee kokeen suorittaja, jonka on otettava huomioon käytettävissä olevat mahdollisuudet ja resurssit laboratoriossa.

▼B

a) Rinnakkaismenetelmä: jokaiselle maa-ainekselle, joka valitaan desorptiotutkimukseen, valmistetaan näytteet samalla maa-aines/-liuos-suhteella ja niin monta näytettä kuin desorptiokinetiikan tutkimiseksi halutaan näytteenottohetkiä. Mieluiten käytetään samoja aikavälejä kuin adsorptiokinetiikkakokeessa; kokonaisaikaa voidaan kuitenkin tarvittaessa pidentää systeemin desorptiotasapainotilan saavuttamiseksi. Jokaisessa kokeessa (yksi maa-aines, yksi liuos) suoritetaan yksi nollakoe. Siinä on maa-ainesta ja 0,01 M $CaCl_2$-liuosta ilman testiainetta, ja painon ja tilavuuden on oltava samat kuin varsinaisessa kokeessa. Vertailunäytteenä suoritetaan testiaineelle 0,01 M $CaCl_2$-liuoksessa (ilman maa-ainesta) sama testimenettely. Kaikkia maa-aines-liuos-seoksia ravistellaan, kunnes adsorptiotasapainotila on saavutettu (mikä määritettiin 2-tason kokeessa). Tämän jälkeen faasit erotetaan sentrifugoimalla ja vesifaasit poistetaan mahdollisimman tarkasti. Poistettu liuostilavuus korvataan samalla tilavuudella 0,01 M $CaCl_2$-liuosta, joka ei sisällä testiainetta, ja uusia seoksia ravistellaan uudelleen. Ensimmäisen koeputken vesifaasi otetaan talteen mahdollisimman tarkasti ja mitataan esimerkiksi 2 tunnin jälkeen, toisen koeputken vesifaasi 4 tunnin, kolmannen koeputken 6 tunnin jälkeen ja niin edelleen, kunnes desorptiotasapainotila on saavutettu.

b) Sarjamenetelmä: adsorptiokinetiikkakokeen jälkeen seos sentrifugoidaan ja vesifaasi poistetaan mahdollisimman tarkasti. Poistettu liuostilavuus korvataan yhtä suurella tilavuudella 0,01 M $CaCl_2$-liuosta, joka ei sisällä testiainetta. Uutta seosta ravistellaan, kunnes desorptiotasapainotila on saavutettu. Tämän ajanjakson aikana seosta sentrifugoidaan tietyin aikavälein faasien erottamiseksi. Testiaine määritetään pienestä määräosasta vesifaasia välittömästi; tämän jälkeen koe jatkuu alkuperäisellä seoksella. Kunkin yksittäisen määräosan tilavuuden on oltava alle yhden prosentin kokonaistilavuudesta. Seokseen lisätään sama määrä tuoretta 0,01 M $CaCl_2$-liuosta maa-aines/liuos-suhteen säilyttämiseksi, ja ravistelu jatkuu seuraavan aikavälin ajan.

Desorboitumisprosentti lasketaan kullakin ajanhetkellä (D_{t_i}) ja/tai aikavälillä ($D_{\Delta t_i}$) (tutkimuksen tarpeiden mukaisesti) ja se esitetään ajan funktiona. Lasketaan myös tasapainotilan desorptiokerroin K_{des}. Kaikki käytettävät yhtälöt esitetään kohdassa ”Tulokset ja niiden raportointi” sekä lisäyksessä 5.

Desorptiokinetiikkakokeen tulokset

Yleisten ajan funktiona esitettävien desorboitumisprosentti- D_{t_i} ja adsorboitumisprosentti- A_{t_i} diagrammien avulla on mahdollista arvioida adsorptioprosessin reversiibeliyttä. Vaikka desorptiotasapainotilan saavuttamiseen menisikin jopa kaksinkertainen aika adsorptiotasapainotilan saavuttamiseen verrattuna ja kokonaisdesorptio olisi yli 75 prosenttia adsorboituneesta maarasta, adsorptiota pidetään reversiibelinä.

1.9.2.5.3 Desorptioisotermit

Freundlichin desorptioisotermit määritetään maa-aineksista, joita on käytetty adsorptioisotermikokeessa. Desorptiotesti suoritetaan kohdassa ”Desorptiokinetiikka” kuvatulla tavalla lukuun ottamatta sitä, että vesifaasi analysoidaan vain kerran, desorptiotasapainotilassa. Lasketaan desorboituneen testiaineen määrä. Maa-ainekseen desorptiotasapainotilassa adsorboituneeksi jääneen testiaineen pitoisuus esitetään liuoksessa olevan testiaineen tasapainokonsentraation funktiona (katso ”Tulokset ja niiden raportointi” sekä lisäys 5).

▼B

2. **TULOKSET JA NIIDEN RAPORTOINTI**

Analyysitiedot esitetään taulukkomuodossa (katso lisäys 6). Niissä esitetään yksittäiset mittaukset ja lasketut keskiarvot sekä adsorptioisotermien graafiset kuvaajat. Laskutoimitukset tehdään jäljempänä kuvatulla tavalla.

Testin tarkoituksia varten sovitaan, että 1 cm^3 vesiliuosta painaa 1 g. Näin maa-aines/liuos-suhde voidaan ilmaista yksikköinä w/w tai w/-vol samalla numerolla.

2.1 ADSORPTIO

Adsorptio (A_{t_i}) määritellään maa-ainekseen adsorboituneen aineen prosenttiosuutena testin alussa lisätystä aineen määrästä. Jos testiaine on stabiili eikä adsorboidu merkittävästi astiaseinämiin, A_{t_i} lasketaan kullakin ajanhetkellä t_i seuraavan yhtälön mukaisesti:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

jossa:

A_{t_i} = adsorboitumisprosentti ajanhetkellä t_i (%)

$m_s^{ads}(t_i)$ = maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa (µg) ajanhetkellä t_i

m_o = testiaineen massa koeputkessa testin alussa (µg).

Yksityiskohtaiset tiedot siitä, kuinka adsorboitumisprosentti A_{t_i} lasketaan rinnakkais- ja sarjamenetelmälle, annetaan liitteessä 5.

Jakautumiskerroin K_d on maa-ainesfaasissa olevan aineen pitoisuuden ja vesiliuoksessa olevan aineen massakonsentraation välinen suhde koeolosuhteissa adsorptiotasapainotilassa.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (4)$$

jossa:

$C_s^{ads}(eq)$ = maa-ainekseen adsorboituneen aineen pitoisuus adsorptiotasapainotilassa (µg g^{-1})

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = vesifaasissa olevan aineen massakonsentraatio adsorptiotasapainotilassa (µg cm^{-3}). Tämä konsentraatio määritetään analyyttisesti nollakokeiden antamat arvot huomioon ottaen

$m_s^{ads}(eq)$ = maa-ainekseen adsorboituneen aineen massa adsorptiotasapainotilassa (µg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = liuoksessa olevan aineen massa adsorptiotasapainotilassa (µg)

m_{soil} = maa-ainesfaasin määrä, maa-aineksen kuiva-aineena ilmaistuna (g)

V_o = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin alkutilavuus (cm^3).

A_{eq}:n ja K_d :n välinen suhde saadaan yhtälöstä

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (5)$$

▼B

jossa:

A_{eq} = adsorboitumisprosentti adsorptiotasapainotilassa, %.

Orgaanisen hiilen suhteen normalisoitu adsorptiokerroin K_{oc} liittää jakautumiskertoimen K_d maa-ainesnäytteen orgaanisen hiilen pitoisuuteen:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \ (cm^3 \ g^{-1}) \quad (6)$$

jossa:

% oc = maa-ainesnäytteessä olevan orgaanisen hiilen prosenttiosuus (g g^{-1}).

K_{oc}-kerroin edustaa yksittäistä arvoa, joka kuvaa pääasiassa ei-polaaristen orgaanisten kemikaalien jakautumista maa-aineksessa tai sedimentissä olevaan orgaaniseen hiileen ja veteen. Näiden kemikaalien adsorboituminen korreloi sorboivan kiintoaineen orgaanisten ainesten pitoisuuden kanssa (7); näin ollen K_{oc}-arvot riippuvat humusjakeiden erityisominaisuuksista, joiden sorptiokyvyt vaihtelevat huomattavasti — tämä johtuu eroista alkuperässä, syntytavassa ja niin edelleen.

2.1.1 **Adsorptioisotermit**

Freundlichin adsorptioisotermien yhtälö liittää adsorboituneen testiaineen määrän tasapainotilassa liuoksessa olevan testiaineen konsentraatioon (yhtälö 8).

Mittaustuloksia käsitellään kuten kohdassa ”Adsorptio”. Kullekin koeputkelle lasketaan adsorptiotestin jälkeen maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen pitoisuus (C_s^{ads}(eq), ilmaistu muualla muodossa x/m). Oletetaan, että tasapainotila on saavutettu ja että C_s^{ads}(eq)kuvaa tasapainoarvoa:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right].V_0}{m_{soil}} (\mu g \ g^{-1}) \quad (7)$$

Yhtälö (8) on Freundlichin adsorptioyhtälö:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g \ g^{-1}) \quad (8)$$

tai lineaarisessa muodossa:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

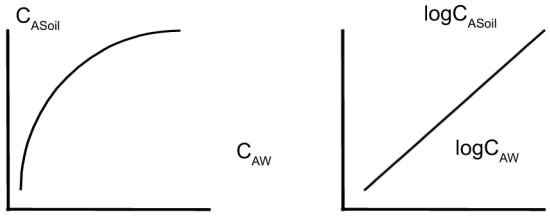
jossa:

K_F^{ads} = Freundlichin adsorptiokerroin; sen yksikkö on cm^3 g^{-1} ainoastaan silloin, kun l/n = 1; kaikissa muissa tapauksissa kulmakerroin 1/n esiintyy K_F^{ads}:n laatua osoittavassa yksikössä ^{ads} ($\mu g^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^{-1}

n = regressiovakio: l/n vaihtelee yleensä välillä 0,7 - 1,0, mikä osoittaa, että sorptiotiedot ovat usein hieman epälineaarisia.

Piirretään yhtälöt (8) ja (9) ja lasketaan K_F^{ads} ja l/n -arvot regressioanalyysillä yhtälöä 9 käyttäen. Lasketaan myös logaritmiyhtälön korrelaatiokerroin r^2. Esimerkit tällaisista käyristä esitetään kuvassa 2.

▼B



Kuva 2. Freundlichin adsorptiokäyrä, normaali ja linearisoitu

2.1.2 **Massatase**

Massatase (MB) on se aineen prosenttiosuus testin alussa lisätystä aineen nimellismäärästä, joka voidaan ottaa analyyttisesti talteen adsorptiotestin jälkeen.

Tulokset käsitellään eri tavalla, kun liuotin sekoittuu täysin veteen. Veteen sekoittuvan liuottimen tapauksessa tulokset voidaan käsitellä kuten kohdassa ”Desorptio” liuotinuuton avulla talteen saadun aineen määrän määrittämiseksi. Jos liuotin sekoittuu veteen niukasti, on talteenotettu määrä mitattava.

Massatase MB adsorptiolle lasketaan seuraavasti: oletetaan, että tekijä (m_E) vastaa maa-aineksesta ja koeastiaseinämistä orgaanisella liuottimella uutettujen testikemikaalimassojen summaa:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \qquad (10)$$

jossa:

MB = massatase (%)

m_E = kahdessa vaiheessa maa-aineksesta ja koeastiaseinämistä uutetun testiaineen kokonaismassa (μg)

C_o = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiliuoksen massakonsentraatio alussa (μg cm^{-3})

V_{rec} = adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen talteen otetun supernatantin tilavuus (cm^{-3})

2.2 DESORPTIO

Desorptio (D) määritellään desorboituneen testiaineen prosenttiosuutena aiemmin adsorboituneen aineen määrästä koeolosuhteissa:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

jossa:

D_{t_i} = desorboitumisprosentti ajanhetkellä t_1 (%)

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = maa-aineksesta desorboituneen testiaineen massa t_i (μg) ajanhetkellä t_i

$m_s^{ads}(eq)$ = maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg).

Yksityiskohtaiset tiedot siitä, kuinka lasketaan desorboitumisprosentti D_{t^i} rinnakkais- ja sarjamenetelmälle, annetaan lisäyksessä 5.

Näennäinen desorptiokerroin (K_{des}) on koeolosuhteissa maa-ainesfaasiin jääneen aineen pitoisuuden suhde desorboituneen aineen massakonsentraatioon vesiliuoksessa silloin, kun desorptiotasapainotila on saavutettu:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

jossa:

K_{des} = desorptiokerroin ($cm^3\ g^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = maa-aineksesta desorboituneen testiaineen kokonaismassa desorptiotasapainotilassa (μg)

V_T = maa-aineksen kanssa desorptiokinetiikkatestin aikana kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus (cm^3).

Ohjeet $m_{aq}^{des}(eq)$:n laskemiseksi annetaan lisäyksessä 5 kohdassa ”Desorptio”.

Huomautus:

Jos edeltävä adsorptiotesti suoritettiin rinnakkaismenetelmää käyttäen, niin yhtälössä (12) esiintyvä tilavuus V_T oletetaan yhtä suureksi kuin V_o.

2.2.1 **Desorptioisotermit**

Freundlichin desorptioisotermien yhtälö yhdistää maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen testiaineen pitoisuuden liuoksessa olevan testiaineen konsentraatioon desorptiotasapainotilassa (yhtälö 16).

Kullekin koeputkelle lasketaan maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen aineen pitoisuus desorptiotasapainotilassa seuraavasti:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$määritellään seuraavasti:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^{A}(\mu g) \quad (14)$$

jossa:

$C_s^{des}(eq)$ = maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen testiaineen pitoisuus desorptiotasapainotilassa (μg g^{-1})

$m_m^{des}(eq)$ = vesifaasista desorptiotasapainotilassa analyyttisesti määritetyn aineen massa (μg)

▼B

m_{aq}^{A} = epätäydellisestä tilavuustäydennyksestä johtuen adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jääneen testiaineen massa (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = liuoksessa olevan aineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_r^F = koeputkesta testiaineen mittaamiseksi otetun liuoksen tilavuus, desorptiotasapainotilassa (cm^3)

V_R = koeputkesta adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen poistetun supernatantin tilavuus, joka korvataan samalla tilavuudella 0,01 M $CaCl_2$-liuosta (cm^3).

Yhtälö (16) on Freundlichin desorptioyhtälö:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

tai lineaarisessa muodossa:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

jossa:

K_F^{des} = Freundlichin desorptiokerroin

n = regressiovakio

$C_{aq}^{des}(eq)$ = vesifaasissa olevan aineen massakonsentraatio desorptiotasapainotilassa (μg cm^{-3}).

Yhtälöt (16) ja (17) voidaan piirtää ja K_F^{des} ja l/n -arvot lasketaan regressioanalyysin avulla yhtälöä 17 käyttäen.

Huomautus:

Jos Freundlichin adsorptio- tai desorptioeksponentti l/n on yhtä kuin 1, Freundlichin adsorption tai desorption sitoutumisvakio (K_F^{ads} ja K_F^{des}) on yhtä suuri kuin adsorptio- tai desorptiotasapainovakiot (vastaavasti K_d ja K_{des}), jolloin C_S vs C_{aq} -käyrät ovat lineaariset. Jos eksponentit ovat erisuuria kuin 1, C_s vs C_{aq} -käyrät eivät ole lineaarisia ja adsorptio- ja desorptiovakiot vaihtelevat isotermien eri kohdissa.

2.2.2 **Testiraportti**

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

— Käytettyjen maa-ainesnäytteiden täydelliset tunnistetiedot, johon sisältyy:

— maantieteellinen sijainti (leveysasteet, pituusasteet),

— näytteenottopäivämäärä,

▼B

— käyttömuoto (esimerkiksi maatalousmaa, metsä),

— näytteenottosyvyys,

— hiekka-, liete- ja savipitoisuus,

— pH-arvot (0,01 M $CaCl_2$:ssa),

— orgaanisen hiilen pitoisuus,

— orgaanisen aineksen pitoisuus,

— typpipitoisuus,

— C/N-suhde,

— kationinvaihtokyky (mmol/kg),

— kaikki maa-ainesnäytteiden keräämiseen ja säilyttämiseen liittyvät tiedot,

— soveltuvin osin kaikki testiaineen adsorptio-desorptiotulkinnan kannalta merkitykselliset tiedot,

— kunkin muuttujan määrittämiseksi käytettyjen menetelmien kirjallisuusviitteet,

— testiainetta koskevat tiedot soveltuvin osin,

— koelämpötilat,

— sentrifugointiolosuhteet,

— analyysimenetelmä testiaineen analysoimiseksi,

— perustelut kaikelle liuottavien aineiden käytölle testiaineen varastoliuosten valmistuksessa,

— selvitykset laskelmissa tehdyistä korjauksista,

— tiedot taulukkomuodossa (liite 6) ja graafiset esitykset,

— kaikki tiedot ja havainnot, jotka helpottavat testitulosten tulkintaa.

3. **LÄHDELUETTELO**

(1) Kukowski H. and Brümmer G, (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Scries 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/-Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), ”Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils”, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), ”Adsorption-Desorption Phenomena” in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), ”The sorption of nonpolar organics by soils and sediments” in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), ”An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media”. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), pp. 29-35.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), ”Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis”, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), ”Movement and sorption of chemicals applied to the soil”. Weeds, 13, pp. 185-190.

(18) Rhodes R. C., Belasco I. J., and Pease H. L., (1970) ”Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils”. J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.

(19) Russell M. H., (1995), ”Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil” in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), ”Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides”, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

▼B

(21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), ”Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils”. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L, and Osgerby J. M., (1967), ”Persistence of herbicides in soil”. J. Sci. Fd Agric., 18, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), ”Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption”. Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.

(24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977). ”Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides”. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.

(25) Osgerby J. M., (1973), ”Process affecting herbicide action in soil”. Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.

(26) Guth J. A., (1972), ”Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden”. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J. W., (1975), ”The interpretation of soil leaching experiments”, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172. Plenum Press. NY.

(28) Helling C. S., (1971). ”Pesticide mobility in soils”. Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker J. W., (1972), ”Diffusion and volatilization” in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds). Vol. 1, pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), ”Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system”. Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), ”Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 2 59, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), ”Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability”. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). ”Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils”. J. of Soil Sci., 28, pp. 340-350.

(34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), ”Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils”. Pest. Sci., 11, pp. 389-395.

(35) Green R. E., and Karickoff S. W., (1990), ”Sorption estimates for modeling”, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101,

(36) Lambert S. M., (1967), ”Functional relationship between sorption in soil and chemical structure”. J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

▼B

(37) Hance R. J., (1969), ”An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils”. J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.

(38) Briggs G. G., (1969), ”Molecular structure of herbicides and their sorption by soils”. Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G. G., (1981). ”Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor”. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), ”Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology”. J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.

(41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), ”Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil”. Residue Rev., 32, pp. 29-92.

(42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg, (1968). ”Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate”. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), ”Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), ”Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners”. Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), ”Adsorption in organic chemicals” in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G. F., 1971, ”Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils”. Weed Sci. 19: pp. 6 7-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975). ”Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils”. Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.

(48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), ”Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations” in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980). ”Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase”, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. ”Methods of Soil Analysis”, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/D1S 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) 1SO/D1S 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), ”Precision in pesticide adsorption measurements”. Soil Sci. Am. Proc., 34, pp. 353-354.

(60) Grover R., and Hance R. J., (1970), ”Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine”. Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J. J. T. I, ”Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system”. Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J. J. T. I. ”Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106”. Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C., (1980), ”Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique”. Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), ”Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments”. J. Environ.Qual., 10(3), pp. 382-386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), ”Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water”. Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), ”Sorption of organic substances by soils and sediments”. J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P. D., and Mantoura R. E. C., (1987), ”Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons”. Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W. J., Reehl W. F., and Rosenblatt D. H., (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I., (1980). ”Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota” in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp. 78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), ”A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds”. Science, Vol. 206, pp. 831-832.

(71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C., (1981), ”Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption”. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), ”Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. Chemosphere Vol. 10(8), pp. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), ”Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilite-reactivite”. Revue de l'Agric, 34 (4), pp. 319-322.

(74) Müller M., Kördel W., (1996). ”Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. Chemosphere, 32(12), pp. 249 3-2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M., (1995), ”HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test”. Chemosphere 30 (7), pp. 1 3 73-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G., (1993), ”HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases”. Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R. J., (1967), ”The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides”. Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W. C., and Harper S. S., (1990), ”The retention processes: mechanisms” in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), ”Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C. H., (1970), ”Interpretation and use of sorption isotherms” in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D., (1960), ”Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils”. J. Chem. Soc, pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C., (1980), ”Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption”. Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), ”Anomalies in the Freundlich equation”, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

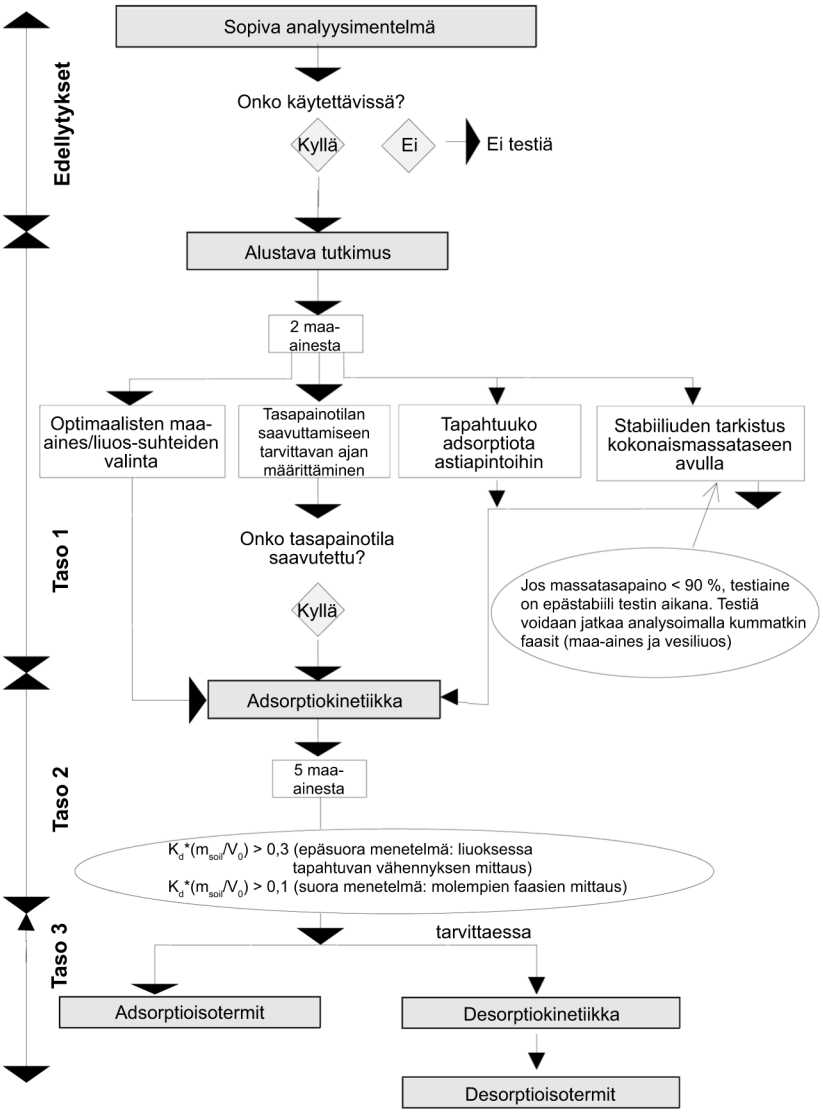
(84) Guth, J. A., (1985), ”Adsorption/desorption”, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

LISÄYS 1

Testikaavio



▼B

Lisäys 2

ANALYYSIMENETELMÄN TARKKUUDEN JA KONSENTRAATIOMUUTOKSEN VAIKUTUS ADSORPTIOTULOSTEN TARKKUUTEEN

Seuraavasta taulukosta (84) käy ilmi, että silloin kun alkuperäisen massan ($m_{aq}^{ads}(eq)$ = 110 µg) ja liuoksessa olevan testiaineen tasapainomassan ($m_s^{ads}(eq)$ = 100 µg) välinen ero on hyvin pieni, 5 prosentin virhe tasapainokonsentraation mittaustuloksissa johtaa 50 prosentin virheeseen maa-ainekseen adsorboituneen aineen pitoisuuslaskelmissa ($m_s^{ads}(eq)$) ja 52,4 prosentin virheeseen K_d-laskelmissa.

Maa-aineksen määrä m_{soil} = 10 g

Liuoksen tilavuus V_o =100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)*$ (µg)	$C_s^{ads}(eq)*$ (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
m_0 = 110 µg tai C_0 = 1,100 µg/cm3	**KUN A = 9 %**							
	100	1,000	todell. arvo	10	1,00	todell. arvo	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
m_0 = 110 µg tai C_0 = 1,100 µg/cm3	**KUN A = 55 %**							
	50,0	0,500	todell. arvo	60,0	6,00	todell. arvo	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
m_0 = 110 µg tai C_0 = 1,100 µg/cm3	**KUN A = 99 %**							
	1,100	0,011	todell. arvo	108,9	10,89	todell. arvo	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}}.Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)}\frac{V_0}{m_{soil}}$

$m_s^{ads}(eq)$ = maa-ainesfaasissa olevan testiaineen massa tasapainotilassa, µg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = vesifaasissa olevan testiaineen massa tasapainotilassa, µg

$C_s^{ads}(eq)$ = testiaineen pitoisuus maa-ainesfaasissa tasapainotilassa, µg g^{-1}

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = testiaineen massakonsentraatio vesifaasissa tasapainotilassa, µg cm^{-3}

R = analyyttinen virhe $m_{aq}^{ads}(eq)$:n määrityksessä

R‡ = analyyttisestä virheestä R johtuva laskettu virhe.

▼B

LISÄYS 3

K_d:N ARVIOINTITEKNIIKAT

1. Arviointitekniikoiden avulla on mahdollista ennustaa K_d-arvoja, jotka perustuvat korrelaatioon esimerkiksi P_{ow}-arvojen kanssa (12) (39) (63-68), vesiliukoisuustietojen kanssa (12) (19) (21) (39) (68-73) tai käänteisfaasi-HPLC:sta johdettujen polaarisuustietojen kanssa (74-76). Taulukoissa 1 ja 2 esitetyt K_{oc} tai K_{om} -arvot on laskettu näistä yhtälöistä ja K_d sitten epäsuorasti yhtälöistä:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} (cm^3\ g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} (cm^3 g^{-1})$$

2. Tämä korrelaatiokäsite perustuu kahteen oletukseen: 1) aineen adsorboitumiseen vaikuttaa pääasiassa juuri maa-aineksen orgaaninen aines; ja 2) kyseeseen tulevat vuorovaikutukset ovat pääasiassa polaarittomia. Täten näitä korrelaatioita ei voida soveltaa polaarisiin aineisiin tai soveltaminen voidaan ulottaa vain tiettyyn rajaan asti, ja niitä ei voida soveltaa silloin, kun orgaanisen aineksen pitoisuus maa-aineksessa on hyvin pieni (12). Vaikka tyydyttäviä P_{ow}:n ja adsorption (19) välisiä korrelaatioita onkin löydetty, samaa ei voida sanoa vesiliukoisuuden ja adsorboitumisasteen (19) (21) välisistä yhteyksistä; tutkimustulokset ovat toistaiseksi hyvin ristiriitaisia.

3. Joitakin esimerkkejä adsorptiokertoimen ja oktanoli-vesi-jakautumiskertoimen välisistä korrelaatioista samoin kuin suhteesta vesiliukoisuuteen esitetään taulukoissa 1 ja 2.

Taulukko 1.

Esimerkkejä adsorptiojakautumiskertoimen ja oktanoli-vesi-jakautumiskertoimen välisistä korrelaatioista; lisäesimerkkejä lähteistä (12) (68).

Aineet	Korrelaatiot	Tekijät
Substituoidut ureat	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Klooratut aromaatit	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$.	Chiou *et al*. (1983) (65)
Erilaiset torjunta-aineet	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{oW}$	Gerstl ja Mingelgrin (1984) (66)
Aromaattiset hiilivedyt	$\log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles ja Mantoura (1987) (67)

Taulukko 2.

Esimerkkejä adsorptiojakautumiskertoimen ja vesiliukoisuuden välisistä korrelaatioista; katso lisäesimerkkejä lähteistä (68) (69).

Aineet	Korrelaatiot	Tekijät
Erilaiset torjunta-aineet	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl ja Mingelgrin (1984) (66)
Alifaattiset, aromaattiset klooratut aineet	$\log K_{om} = (4,040 +/- 0,038) - (0,557 +/- 0,012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α-naftoli	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Sykliset, alifaattiset aromaattiset aineet	$\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Erilaiset yhdisteet	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Lisäys 4

SENTRIFUGOINTIOLOSUHTEIDEN LASKEMINEN

1. Sentrifugointiaika saadaan seuraavasta kaavasta olettaen, että partikkelit ovat pallomaisia:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \qquad (1)$$

Yksinkertaisuuden vuoksi kaikki muuttujat esitetään muina kuin SI-yksikköinä (g, cm),

jossa:

ω pyörimisnopeus (=2 π rpm/60), rad s^{-1}

rpm kierrosta minuutissa

η liuoksen viskositeetti, g s^{-1} cm^{-1}

r_p partikkelin säde, cm

ρ_s maa-aineksen tiheys, g cm^{-3}

ρ_{aq} liuoksen tiheys, g cm^{-3}

R_t etäisyys sentrifugipyörijän keskikohdasta sentrifugiputkessa olevan liuoksen yläpintaan, cm

R_b etäisyys sentrifugipyörijän keskikohdasta sentrifugiputken pohjaan, cm

R_b-R_t maa-aines/liuos-seoksen pituusmitta sentrifugiputkessa, cm.

Käytännössä lasketut ajat yleensä kaksinkertaistetaan täydellisen erottumisen varmistamiseksi.

2. Yhtälöä (1) voidaan edelleen yksinkertaistaa, jos oletetaan, että liuoksen viskositeetti (η) ja tiheys (ρ_{aq}) on yhtä suuri kuin veden viskositeetti ja tiheys lämpötilassa 25 °C; tällöin η = 8,95 x 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} ja ρ_{aq} = 1,0 g. cm^{-3}.

Tämän jälkeen sentrifugointiaika saadaan yhtälöstä (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2(\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Yhtälöstä (2) käy ilmi, että sentrifugointiolosuhteiden eli ajan (t) ja nopeuden (rpm) määrittäminen perustuu kahteen tärkeään muuttujaan, jotta määrätynkokoiset partikkelit saadaan erotetuksi (tässä tapauksessa säde on 0,1 μm): 1) maa-aineksen tiheys ja 2) seoksen pituus sentrifugiputkessa (R_b-R_t), eli väli, jolla esiintyy maa-ainespartikkeleita liuoksen yläreunasta koeputken pohjaan; tällöin on selvää, että kun putkessa olevan seoksen tilavuus on sama, seoksen pituus koeputkessa riippuu koeputken säteen neliöstä.

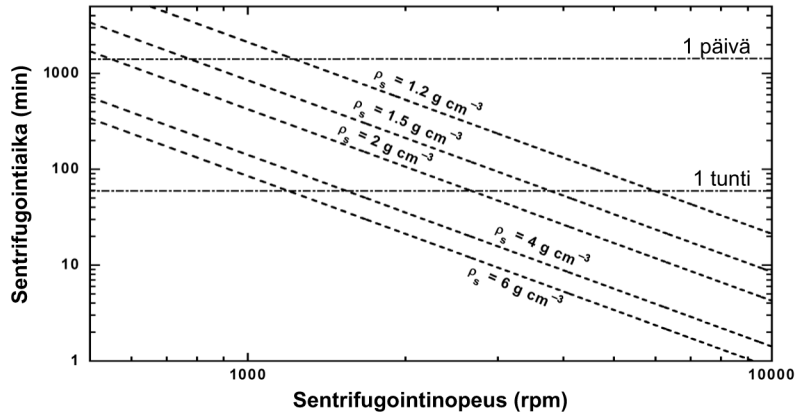
4. Kuvassa 1 esitetään, kuinka sentrifugointinopeuden (rpm) funktiona esitetty sentrifugointiaika (t) vaihtelee eri maa-ainestiheyksillä (ρ_s) (kuva 1b) ja silloin, kun seoksen pituus sentrifugiputkissa on erilainen (kuva 2a). Kuvassa 1a näkyy selvästi maa-aineksen tiheyden vaikutus; esimerkiksi klassisella 3 000 rpm:n sentrifugoinnilla sentrifugointiaika on noin 240 minuuttia, kun maa-aineksen tiheys on 1,2 g/cm^3, ja vain 50 minuuttia, kun tiheys on 2,0 g/cm^3. Vastaavasti kuvasta 1b näkyy, kuinka klassisella 3 000 rpm:n sentrifugoinnilla sentrifugointiaika on noin 50 minuuttia, kun seoksen pituus on 10 cm, ja vain 7 minuuttia, kun pituus on 1 cm. Sentrifugointituloksen kannalta on edullisinta, jos putkessa olevan seoksen pituus on mahdollisimman pieni, ja käsittely taas on helpointa, jos putkessa olevan seoksen pituus on suuri; tässä on löydettävä paras kompromissi.

▼B

5. Lisäksi silloin, kun määritellään koeolosuhteita maa-aines/liuos-faasien erottelemiseksi, on tärkeää ottaa huomioon mahdollinen kolmannen ”pseudofaasin” eli kolloidien olemassaolo. Näillä partikkeleilla, joiden koko on alle 0,2 μm, voi olla merkittävä vaikutus aineen koko adsorptiomekanismiin maa-ainessuspensiossa. Kun sentrifugointi suoritetaan edellä kuvatulla tavalla, jäävät kolloidit vesifaasiin ja joutuvat analyysiin yhdessä vesifaasin kanssa. Tällöin tiedot niiden vaikutuksista jäävät saamatta.

   Jos suorittavalla laboratoriolla on ultrasentrifugointi- tai ultrasuodatusmahdollisuus, aineen adsorptiota/desorptiota maa-aineksessa voidaan tutkia syvemmin, mukaan lukien tiedot aineen adsorboitumisesta kolloideihin. Tällöin olisi käytettävä ultrasentrifugointinopeutta 60 000 rpm/min tai ultrasuodatusta suodatinhuokoisuudella 100 000 Daltonia, jotta nämä kolme faasia voidaan erottaa: maa-aines, kolloidit, liuos. Testimenetelmää on myös muunneltava tämän mukaisesti, jotta kaikista kolmesta faasista voitaisiin suorittaa aineen analysointi.

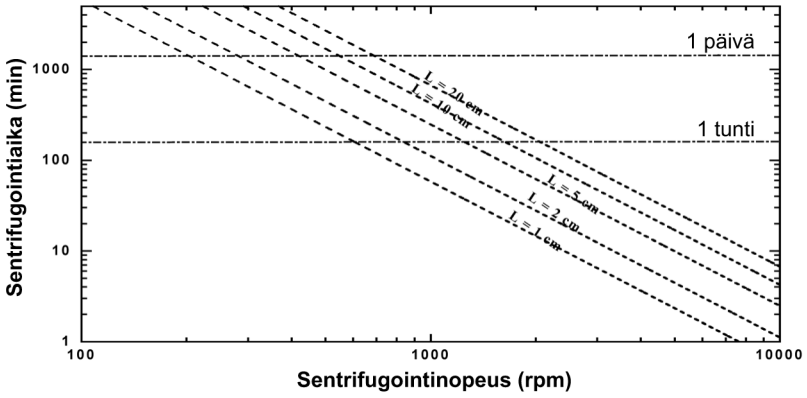
Kuva 1a.



Sentrifugointinopeuden (rpm) funktiona esitetyn sentrifugointiajan (t) vaihtelu eri maa-ainestiheyksille

(ρ_s) . R_t = 10 cm, R_b -R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} ja p_{aq} = 1,0 g cm^{-3}, kun 25 °C.

Kuva 1b.



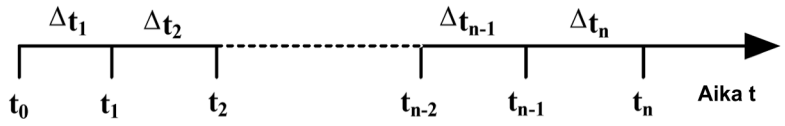
Sentrifugointinopeuden (rpm) funktiona esitetyn sentrifugointiajan (t) vaihtelu silloin, kun sentrifugiputkessa olevan seoksen pituus on erilainen (Rb - Rt) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1}, p_{aq} = 1,0 g cm^{-3} kun 25 °C ja (ρ_s) = 2,0 g cm^{-3}

▼B

LISÄYS 5

ADSORPTION A (%) JA DESORPTION D (%) LASKEMINEN

Menettelyn aikakaavio on:



Kaikissa laskelmissa oletetaan, että testiaine on stabiili eikä adsorboidu merkittävästi astiaseinämiin.

ADSORPTIO A (A %)

a) *Rinnakkaismenetelmä*

Adsorboitumisprosentti lasketaan kullekin koeputkelle (i) kullakin ajanhetkellä (t_i) seuraavan yhtälön mukaisesti:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Tämän yhtälön tekijät voidaan puolestaan laskea seuraavasti:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

joissa:

A_{t_i} = adsorboitumisprosentti (%) ajanhetkellä t_i

$m_s^{ads}(t_i)$ = testiaineen massa maa-aineksessa ajanhetkellä t_i, kun analyysi suoritetaan (μg)

m_o = testiaineen massa koeputkessa testin alussa (μg)

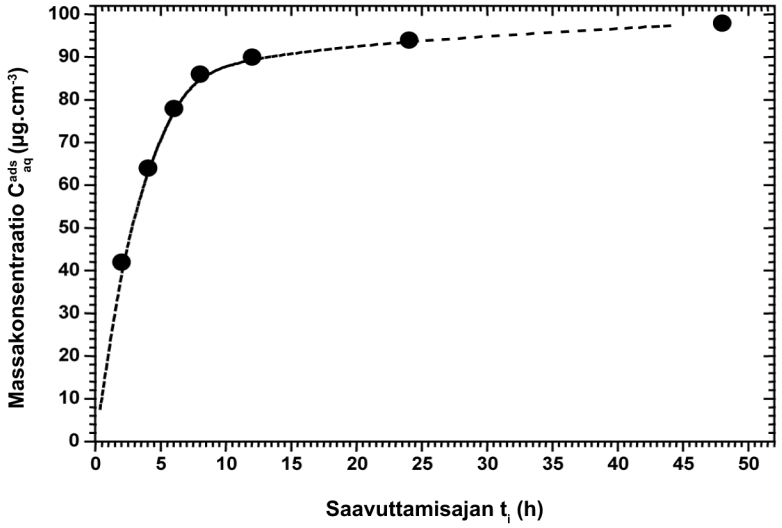
C_o = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiliuoksen massakonsentraatio alussa (μg cm^{-3})

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = aineen massakonsentraatio vesifaasissa ajanhetkellä t_i, kun analyysi suoritetaan (µg cm^{-3}); tämä konsentraatio määritetään analyyttisesti ottaen huomioon nollakokeista saadut arvot

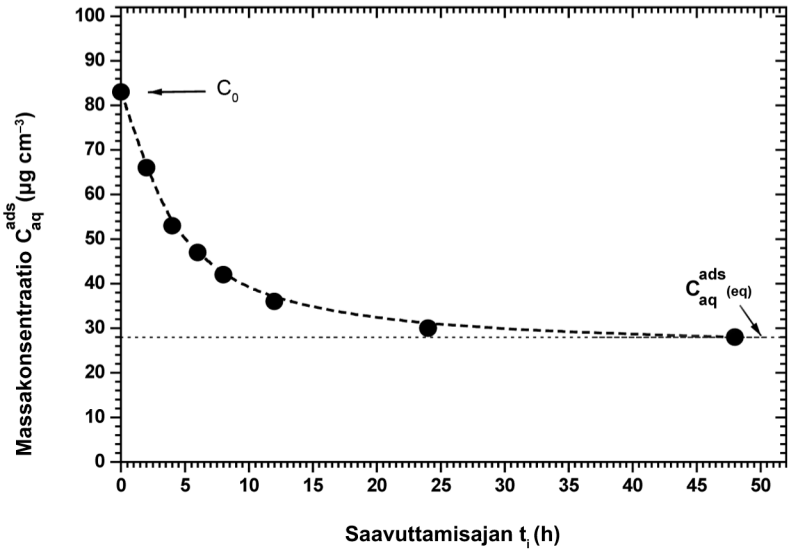
V_o = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiliuoksen alkutilavuus (cm^3).

Adsorboitumisprosenttien arvot A_{t_i} tai $C_{aq}^{ads}(t_i)$ esitetään ajan funktiona ja määritetään aika, joka kuluu sorptiotasapainotilan saavuttamiseen. Esimerkkejä tällaisista käyristä esitetään kuvassa 1 ja kuvassa 2.



Kuva 1.

adsorptiotasapainokäyrä



Kuva 2.

Testiaineen massakonsentraatio vesifaasissa (C_{aq}) ajan funktiona

▼B

b) *Sarjamenetelmä*

Seuraavissa yhtälöissä otetaan huomioon, että adsorptiokoe suoritetaan mittaamalla testiaine vesifaasin pienistä määräosista ja määrätyin aikavälein.

— Kullakin aikavälillä maa-ainekseen adsorboituneen aineen määrä lasketaan seuraavasti:

— emsimmâisella aikavâlilla $\Delta t_i = t_i - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

— toisellä aikavälillä $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

— kolmannella aikavälillä $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— ninnellä aikavälillä $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{\left(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A \right)}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— Adsorboitumisprosentti kullakin aikavälillä, $A_{\Delta t_i}$, lasketaan seuraavaa yhtälöä käyttäen:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

kun taas adsorboitumisprosentti A_{t_i} ajanhetkellä t_i saadaan yhtälöstä:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Adsorptioarvot A_{t_i} tai $A_{\Delta t_i}$ (tutkimuksen tarpeiden mukaisesti) esitetään ajan funktiona ja määritetään aika, joka kuluu sorptiotasapainotilan saavuttamiseen.

— Ajanhetkellä, jolloin tasapainotila on saavutettu t_{eq}:

— maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa on:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— liuoksessa olevan testiaineen massa on:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— ja adsorboitumisprosentti tasapainotilassa on:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Edellä käytetyt muuttujat määritellään seuraavasti:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), ..., m_s^{ads}(\Delta t_n)$	= maa-ainekseen aikavälillä Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} adsorboituneeksi jääneen aineen massa (μg)
$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), ..., m_n^{ads}(t_n)$	= määräosasta v_a^A mitatun aineen massa ajanhetkellä t_1, t_2,t_n (μg)
$m_s^{ads}(eq)$	= maa-ainekseen adsorboituneen aineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg)
$m_s^{ads}(eq)$	= liuoksessa olevan aineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg)
v_a^A	= määräosan tilavuus, josta testiaine mitataan (cm^3)
$A_{\Delta t_i}$	= aikaväliä Δt_i vastaava adsorboitumisprosentti (%)
A_{eq}	= adsorboitumisprosentti adsorptiotasapainotilassa (%).

DESORPTIO D (%)

Ajanhetki t_0, jolloin desorptiokinetiikkakoe alkaa, on hetki, jolloin talteenotettu testiaineliuos, jonka tilavuus on suurimmillaan kun adsorptiotasapainotila on saavutettu, korvataan yhtä suurella tilavuusmäärällä 0,01 M $CaCl_2$-liuosta.

a) *Rinnakkaismenetelmä*

Ajanhetkellä t_i mitataan testiaineen massa koeputkesta i (V_r^i) otetusta vesifaasista ja desorboitunut massa lasketaan seuraavan yhtälön mukaisesti:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Desorptiotasapainotilassa $t_i = t_{eq}$ ja siten $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

Aikavälillä (Δt_i) desorboituneen testiaineen massa saadaan yhtälöstä:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Desorboitumisprosentti lasketaan:

ajanhetkellä t_i yhtälöstä:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

ja aikavälillä (Δt_i) yhtälöstä:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

jossa

D_{t_i} = desorboitumisprosentti ajanhetkellä t_i (%)

$D_{\Delta t_i}$ = aikaväliä Δt_i vastaava desorboitumisprosentti (%)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = ajanhetkellä t_i desorboituneen testiaineen massa (µg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = aikavälillä Δt_i desorboituneen testiaineen massa (µg)

$m_m^{des}(t_i)$ = analyyttisesti mitatun testiaineen massa ajanhetkellä t_i liuostilavuudessa V_r^i, joka otetaan analyysiä varten (µg)

m_{aq}^{A} = epätäydellisen tilavuustäydennyksen vuoksi adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jääneen testiaineen massa (µg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = liuoksessa olevan testiaineen massa adsorptiotasapainotilassa (µg)

V_R = adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen koeputkesta poistetun supernatantin tilavuus, joka korvataan samalla tilavuusmäärällä 0,01 M $CaCl_2$-liuosta (cm^3)

V_r^i = testiaineen mittaamiseksi koeputkesta (i) otetun liuoksen tilavuus, desorptiokinetiikkakokeessa (cm^3).

Desorptioarvot D_{t_i} tai $D_{\Delta t_i}$ (tutkimustarpeiden mukaisesti) esitetään ajan funktiona, ja desorptiotasapainotilan saavuttamiseen kuluva aika määritetään.

b) *Sarjamenetelmä*

Seuraavissa yhtälöissä otetaan huomioon se, että edeltänyt adsorptiokoe on suoritettu määrittämällä testiaine vesifaasin pienistä määräosista (v_a^A) (sarjamenetelmä 1.9 kohdassa ”Testin suorittaminen”). Oletetaan, että: a) adsorptiokinetiikkakokeen jälkeen koeputkesta poistetun supernatantin tilavuus on korvattu samalla tilavuusmäärällä 0,01 M $CaCl_2$-liuosta (V_R) ja b) maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus (V_T) säilyy desorptiokinetiikkakokeen aikana vakiona ja se saadaan yhtälöstä:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

Ajanhetkellä t_i:

— Testiaineen massa mitataan pienistä määräosista (v_a^D) ja desorboitunut massa lasketaan seuraavan yhtälön mukaisesti:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— Desorptiotasapainotilassa $t_i = t_{eq}$ ja siten $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— Desorboitumisprosentti D_{t_i} lasketaan seuraavasta yhtälöstä:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

Aikavälillä (Δt_i):

Kullakin aikavälillä desorboituneen aineen määrä lasketaan seuraavasti:

— ensimmäisellä aikavälillä $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— toisellä aikavälillä $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

and

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad (22)$$

— ninnellä aikavälillä n^{th} $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,\, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

and

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,\, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Lopuksi lasketaan desorboitumisprosentti kullakin aikavälillä, $D_{\Delta t_i}$, seuraavaa yhtälöä käyttäen:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

kun taas desorboitumisprosentti D_{t_i}, ajanhetkellä t_i saadaan yhtälöstä:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

▼B

jossa edellä käytetyt muuttujat määritellään seuraavasti:

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = maa-ainekseen aikavälillä Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n adsorboituneeksi jääneen aineen massa (μg)

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = aikavälillä Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n desorboituneen testiaineen massa (μg)

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = määräosasta ($v^D{}_a$) mitatun aineen massa ajanhetkellä t_1, t_2, ..., t_n (μg)

V_T = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus sarjamenetelmällä suoritetun desorptiokinetiikkakokeen aikana (cm^3)

m_{aq}^A = epätäydellisen tilavuustäydennyksen vuoksi adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jääneen testiaineen massa (μg)

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen koeputkesta poistetun supernatantin tilavuus, joka korvataan samalla tilavuusmäärällä 0,01 M $CaCl_2$-liuosta (cm^3)

v_a^D = sarjamenetelmällä suoritetun desorptiokinetiikkakokeen aikana koeputkesta (i) analysoitavaksi otetun määräosan tilavuus (cm^3)

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

LISÄYS 6

ADSORPTIO-DESORPTIO MAA-AINEKSISSA: TULOSTEN RAPORTOINTILOMAKE

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C. 12 h): %

Lämpötila: °C

Analyysimenetelmän soveltuvuus

Punnittu maa-aines	g	
Maa-aines: kuivapaino	g	
$CaCl_2$-liuoksen tilavuus	cm^3	
Loppuliuoksen nimelliskonsentraatio	$\mu g\ cm^{-3}$	
Loppuliuoksen analyyttinen konsentraatio	$\mu g\ cm^{-3}$	

Käytetyn analyysimenetelmän periaate: Analyysimenetelmän kalibrointi:

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h): %

Lämpötila: °C

Käytetty analyysimenetelmä: Epäsuora ☐ Rinnakkais ☐ Sarja ☐ Suora ☐

Adsorptiotesti: testinäytteet

	Symboli	Yksikkö	Tasapainottumisaika		Tasapainottumisaika		Tasapainottumisaika		Tasapainottumisaika	
Koeputki n:o										
Punnittu maa-aines	—	g								
Maa-aines:	m_{soil}	g								
Veden tilavuus punnitussa maa-aineksessa (laskettu)	V_{WS}	cm^3								
Maa-aineksen tasapainottamiseksi käytetyn 0,01 M $CaCl_2$-liuoksen tilavuus		cm^3								
Varastoliuoksen tilavuus		cm^3								
Maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus	V_0	cm^3								
Testiliuoksen alkukonsentraatio	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Testiaineen massa testin alussa	m_0	µg								

▼B

	Symboli	Yksikkö	Tasapainottu-misaika		Tasapainottu-misaika		Tasapainottu-misaika		Tasapainottu-misaika	
Ravistelun ja sentrifugoinnin jälkeen										
EPÄSUORA MENETELMÄ										
Rinnakkaismenetelmä										
Testiaineen konsentraatio vesifaa-sissa nollakokeen korjaus huomioituna	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Sarjamenetelmä										
Testiaineen mitattu massa määräosassa V_a^A	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
SUORA MENETELMÄ										
Maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Adsorption laskeminen										
Adsorptio	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Keskiarvo										
Adsorptiokerroin	K_d	cm^3 g^{-1}								
Keskiarvo										
Adsorptiokerroin	K_{oc}	cm^3 g^{-1}								
Keskiarvo										

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h): %

Lämpötila: °C

Adsorptiotesti: nolla- ja vertailukokeet

	Symboli	Yksikkö	Nollakoe		Nollakoe		Vertailukoe	
Koeputki n:o								
Punnitut maa-ainekset		g					0	0
Veden määrä punnitussa maa-aineksessa (laskettu)		cm^3					—	—
Lisätyn 0,01 M $CaCl_2$,-liuoksen tilavuus		cm^3						
Lisätyn testiaineen varastoliuoksen tilavuus		cm^3	0	0				
Vesifaasin kokonaistilavuus (laskettu)		cm^3					—	—

▼B

	Symboli	Yksikkö	Nollakoe		Nollakoe		Vertailukoe	
Vesifaasissa olevan testiaineen alkukonsentraatio		µg cm^{-3}						
Ravistelun ja sentrifugoinnin jälkeen								
Konsentraatio vesifaasissa		µg cm^{-3}						

Huomautus: sarakkeita voidaan tarvittaessa lisätä.

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h): %

Lämpötila: °C

Massatase

	Symboli	Yksikkö				
Koeputki n:o						
Punnittu maa-aines	—	g				
Maa-aines: kuivapaino	ms_{oil}	g				
Punnitussa maa-aineksessa olevan veden tilavuus (laskettu)	V_{WS}	ml				
Maa-aineksen tasapainottamiseksi käytetyn 0,01 M $CaCl_2$-liuoksen määrä		ml				
Varastoliuoksen tilavuus		cm^3				
Maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus	V_0	cm^3				
Testiliuoksen	C_0	µg cm^{-3}				
Tasapainottumisaika	—	h				
Ravistelun ja sentrifugoinnin jälkeen						
Testiainekonsentraatio vesifaasissa adsorptiotasapainotilassa nollakokeen korjaus huomioituna	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Tasapainottumisaika	t_{eq}	h				
1. laimennus liuotinta käyttäen						
Poistetun vesifaasin tilavuus	V_{rec}	cm^3				
Lisätyn liuottimen tilavuus	ΔV	cm^3				
1. uutto liuotinta käyttäen						
Analysaattorisignaali — liuotin	S_{E1}	eril.				
Testiaineen konsentraatio liuottimessa	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Symboli	Yksikkö				
Maa-aineksesta ja astiaseinämistä uutetun aineen massa	m_{E1}	µg				
2. laimennus liuotinta käyttäen						
Poistetun liuottimen tilavuus	ΔV_s	cm^3				
Lisätyn liuottimen tilavuus	$\Delta V'$	cm^3				
2. uutto liuotinta käyttäen						
Analysaattorisignaali — liuotinfaasi	S_{E2}	eril.				
Testiaineen konsentraatio liuottimessa	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Maa-aineksesta ja astiaseinämistä uutetun aineen massa	m_{E2}	µg				
Kahdessa vaiheessa uutetun testiaineen kokonaismassa	m_E	µg				
Massatase	MB	%				

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h):

Lämpötila:

Adsorptioisotermit

	Symboli	Yksikkö								
Koeputki n:o										
Punnittu maa-aines	—	g								
Maa-aines: kuivapaino	E	g								
Veden tilavuus punnitussa maa-aineksessa (laskettu)	V_{WS}	cm^3								
Maa-aineksen tasapainottamiseksi käytetyn 0,01 M $CaCl_2$-liuoksen tilavuus		cm^3								
Lisätyn varastoliuoksen tilavuus		cm^3								
Maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus (laskettu)	V_0	cm^3								
Liuoskonsentraatio	C_0	µg cm^{-3}								
Tasapainottumisaika	—	h								

▼B

	Symboli	Yksikkö								
Ravistelun ja sentrifugoinnin jälkeen										
Aineen konsentraatio vesifaasissa nollakokeen korjaus huomioituna	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Lämpötila		^{o}C								
Maa-ainesyksikköä kohden adsorboitunut massa	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regressioanalyysi:

K_F^{ads}-arvo:

l/n-arvo:

regressiokerroin r^2:

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h):

Lämpötila:

Käytetty analyysimenetelmä: Epäsuora ☐ Rinnakkais ☐ Sarja ☐

Desorptiotesti

		Symboli	Yksiköt	Aikaväli	Aikaväli	Aikaväli	Aikaväli
Adsorptiovaiheesta saatavan koeputken n:o							
Maa-ainekseen adsorboituneen aineen massa adsorptiotasapainotilassa		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Poistetun vesifaasin tilavuus, korvataan 0,01 M $CaCl_2$:lla		V_R	cm^3				
Maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus	RM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Epätäydellisen tilavuustäydennyksen vuoksi adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jäävän testiaineen massa		m_{aq}^{A}	µg				

Desorptiokinetiikka

Ajanhetkellä t_i mitatun maa-aineksesta desorboituneen aineen massa		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Koeputkesta (i) testiaineen mittaamiseksi otetun liuoksen tilavuus	RM	V_r^i	cm^3				
	SM	v_a^D	cm^3				
Ajanhetkellä t_i maa-aineksesta desorboituneen aineen massa (laskettu)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Aikavälillä Δt_i maa-aineksesta desorboituneen aineen massa (laskettu)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Symboli	Yksiköt	Aikaväli	Aikaväli	Aikaväli	Aikaväli
Desorboitumisprosentti						
Desorptio ajanhetkellä t_i	D_{ti}	%				
Desorptio aikavälillä Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Näennäinen desorptiokerroin	K_{des}					

RM: Rinnakkaismenetelmä

SM: Sarjamenetelmä

▼B

C.19 MAA-AINEKSIIN JA VIEMÄRILIETTEESEEN SOVELLETTAVAN ADSORPTIOKERTOIMEN (K_{oc}) MÄÄRITYS KORKEAN SUORITUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIALLA (HPLC)

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testimenetelmästä TG 121 (2000).

1.1 JOHDANTO

Aineiden sorptiokäyttäytymistä maa-aineksiin ja viemärilietteeseen voidaan kuvata muuttujilla, jotka voidaan määrittää kokeellisesti testimenetelmällä C 18. Tärkeä muuttuja on adsorptiokerroin, joka on määritelmän mukaan aineen maa-aineksessa tai viemärilietteessä olevan konsentraation ja adsorptiotasapainossa vesifaasissa olevan konsentraation suhde. Maa-aineksen orgaanisen hiilen pitoisuuden suhteen normalisoitua adsorptiokerrointa K_{oc} voidaan käyttää osoittamaan kemiallisen aineen sitoutumiskykyä maa-aineksen tai viemärilietteen orgaaniseen ainekseen, jolloin eri kemikaaleja voidaan verrata. Tämä muuttuja voidaan arvioida vesiliukoisuuden ja n-oktanoli-vesijakautumiskertoimen suhteen tehtyjen korrelaatioiden avulla (1) (2) (3) (4) (5) {6} (7).

Tässä testiohjeessa kuvatussa menetelmässä käytetään HPLC:tä adsorptiokertoimen K_{oc} määrittämiseksi maa-aineksessa ja viemärilietteessä (8). Estimaatit ovat luotettavampia kuin QSAR-laskelmista saadut (9). Estimointimenetelmänä tämä menetelmä ei kuitenkaan voi täysin korvata testimenetelmässä C 18 kuvattua erätasapainomenetelmää. Estimoitua K_{oc}-arvoa voidaan kuitenkin käyttää valittaessa testimuuttujia testimenetelmän C 18 mukaan tehtäviin adsorptio-desorptiokokeisiin laskemalla K_d (jakautumiskerroin) tai K_f (Freundlichin adsorptiokerroin) yhtälöstä 3 (jakso 1.2).

1.2 MÄÄRITELMÄT

K_d: jakautumiskerroin: liuenneen testiaineen tasapainokonsentraatioiden C suhde kaksifaasijärjestelmässä, joka koostuu sorbentista (maa-aines tai viemäriliete) ja vesifaasista. Arvo on paljas luku, jos konsentraatiot on ilmaistu molemmissa faaseissa painoyksiköissä. Jos vesifaasin konsentraatio ilmaistaan painoyksikköinä tilavuusyksikköä kohti, laatu on $ml \cdot g^{-1}$. K_d voi vaihdella sorbentin ominaisuuksien mukaan, ja se voi olla konsentraatiosta riippuvainen.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} or \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

jossa:

C_{soil} = testiaineen tasapainokonsentraatio maa-aineksessa ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{sludge} = testiaineen tasapainokonsentraatio viemärilietteessä ($\mu g \cdot g^{-1}$)

$C_{aq|}$ = testiaineen tasapainokonsentraatio vesifaasissa ($\mu g \cdot g^{-1}$, $\mu g \cdot ml^{-1}$).

▼B

K_f: Freundlichin adsorptiokerroin: testiaineen konsentraatio maa-aineksessa tai viemärilietteessä (x/m), kun tasapainokonsentraatio vesifaasissa (C_{aq}) on yksi; laatu on $\mu g \cdot g^{-1}$ sorbenttia. Arvo voi vaihdella sorbentin ominaisuuksien mukaan.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\cdot\log C_{aq} \quad (2)$$

jossa:

x/m = sorbentin määrään m (g) adsorboituneen testiaineen määrä x (μg) tasapainotilassa

l/n = Freundlichin adsorptioisotermikuvaajan kulmakerroin

C_{aq} = testiaineen tasapainokonsentraatio vesifaasissa ($\mu g \cdot ml^{-1}$)

$$AtC_{aq} = 1; \log K_f = \log\frac{x}{m}$$

K_{oc}: Sorbentin orgaanisen hiilen pitoisuuden (f_{oc}) suhteen normalisoitu aineen jakautumiskerroin (K_d) tai ainetta koskeva Freundlichin adsorptiokerroin (K_f). Erityisesti ionisoitumattomille kemikaaleille se osoittaa suunnilleen aineen ja sorbentin välisen adsorption määrän, ja sen avulla voidaan verrata eri kemikaaleja. K_d:n ja K_f:n laaduista riippuen K_{oc} voi olla laaduton tai sen laatu voi olla $ml \cdot g^{-1}$ tai $\mu g \cdot g^{-1}$ orgaanista ainetta.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}((\text{laaduton tai } ml\cdot g^{-1}) \text{tai} \frac{Kf}{foc}(\mu g\cdot g^{-1}) \quad (3)$$

K_{oc}:n ja K_d:n suhde ei ole aina lineaarinen, ja siten K_{oc}-arvot voivat vaihdella maa-ainesten välillä, mutta vaihtelun määrä on paljon pienempi kuin K_d- tai K_f-arvojen vaihtelu.

Adsorptiokerroin (K_{oc}) johdetaan kapasiteettikertoimesta (k'} käyttämällä kuvaajaa, jossa log k' esitetään log K_{oc}:n funktiona valikoiduille vertailuyhdisteille.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

jossa:

t_R = testiaineen ja vertailuaineen HPLC-retentioaika (minuuttia)

t_0 = HPLC:n kuollut aika (minuuttia) (ks. jakso 1.8.2).

P_{ow}: Oktanoli-vesijakautumiskerroin: n-oktanoliin liukenevan ja veteen liukenevan aineen konsentraatioiden suhde, joka on laaduton suure.

$$Pow = \frac{Coktanoli}{Caq} (= Kow) \quad (5)$$

1.3 VERTAILUAINEET

Aineen rakennekaava, puhtaus ja hajoamisvakio (tarvittaessa) olisi tiedettävä ennen kuin menetelmää käytetään. Veteen ja orgaanisiin liuottimiin liukenemista, oktanoli-vesijakautumiskerrointa ja hydrolyysiominaisuuksia koskevat tiedot ovat hyödyllisiä.

▼B

Jotta mitatut HPLC-retentiotulokset voidaan korreloida aineen adsorptiokertoimen K_{oc} kanssa, on laadittava kalibrointikuvaaja, jossa log K_{oc} esitetään log k':n funktiona. Kuvaajassa on oltava vähintään kuusi referenssipistettä, joista vähintään yhden on oltava testiaineen odotetun arvon yläpuolella ja yhden sen alapuolella. Menetelmän tarkkuus paranee huomattavasti, jos vertailuaineet ovat rakenteeltaan testiaineen kaltaisia. Jos tällaisia tietoja ci ole saatavilla, käyttäjän on valittava sopivat kalibrointiaineet. Siinä tapauksessa olisi valittava rakenteellisesti heterogeenisiä aineita. Käyttökelpoisia aineita ja K_{oc}-arvoja esitetään viemärilietteelle lisäyksen taulukossa 1 ja maa-aineksille taulukossa 3. Jos valitaan muita kalibrointiaineita, ne on perusteltava.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

HPLC tehdään analyyttisillä pylväillä, jotka on pakattu kaupallisesti saatavilla lipofiilisiä ja polaarisia osia sisältävillä syanopropyylipohjaisilla kiinteillä faaseilla. Stationaarifaasina käytetään suhteellisen polaarista silikamatriisipohjaista ainetta:

— O — Si	— CH_2 — CH_2 — CH_2	— CN
silika	pooliton spacer-aine	polaarinen osa

Testimenetelmän periaate on samankaltainen kuin testimenetelmän A 8 (jakautumiskerroin, HPLC-menetelmä) periaate. Kun testiaine kulkee pylvään läpi liikkuvan faasin mukana, se reagoi stationaarifaasin kanssa. Koska testiaine jakautuu liikkuvaan ja stationaariseen faasiin, sen kulku hidastuu. Koska stationaarifaasissa on sekä polaarisia että poolittomia paikkoja, sekä molekyylin polaariset että poolittomat ryhmät voivat reagoida samalla tavalla kuin maa-aineksen tai viemärilietteen sisältämän orgaanisen aineksen kanssa. Tämän ansiosta voidaan määrittää pylvääseen liittyvän retentioajan ja orgaaniseen aineeseen tapahtuvan imeytymisen adsorptiokertoimen välinen suhde.

pH:lla on huomattava vaikutus sorptiokäyttäytymiseen erityisesti polaarisilla aineilla. Maanviljelysmaa-aineksissa tai viemärivesien käsittelylaitosten tankeissa pH vaihtelee tavallisesti välillä 5,5 - 7,5. Ionisoituville aineille olisi tehtävä kaksi testiä sekä ionisoituneessa että ionittomassa muodossa sopivissa puskuriliuoksissa, mutta vain silloin, kun vähintään 10 % testiaineesta dissosioituu välillä pH 5,5 - 7,5.

Koska arviointiin käytetään vain HPLC-pylvästä koskevan retentioajan ja adsorptiokertoimen välistä suhdetta, kvantitatiivista määritysmenetelmää ei tarvita ja vain retentioajan määritys on tarpeen. Jos on käytettävissä sopivia vertailuaineita ja koeolosuhteet ovat vakioidut, tämä menetelmä on nopea ja tehokas keino arvioida adsorptiokerroin K_{oc}.

1.5 TESTIN SOVELTAMISALA

HPLC-menetelmä sopii sellaisille kemiallisille aineille (riippumatta siitä, onko niissä erityisiä merkkiaineita tai esim. radioaktiivista leimaa), joille on käytettävissä sopiva detektiomenetelmä (esim. spektrofotometrinen tai radioaktiivisen säteilyn mittalaite) ja jotka pysyvät riittävän stabiileina kokeen aikana. Menetelmä voi olla erityisen hyvä sellaisille aineille, joita on vaikea tutkia muunlaisissa koejärjestelyissä (ts. haihtuvat aineet tai aineet, jotka eivät liukene veteen sellaisessa pitoisuudessa, että se voidaan mitata tarkasti; aineet, joilla on suuri affiniteetti inkubaatiojärjestelmien pintaan). Menetelmää voidaan käyttää seoksille, joiden eluutiovyöhykkeet eivät erotu toisistaan. Silloin olisi ilmoitettava testiseokseen sisältyvien yhdisteiden log K_{oc}-arvojen ylä- ja alarajat.

▼B

Epäpuhtaudet voivat joskus aiheuttaa ongelmia HPLC-tulosten tulkinnassa, mutta ne eivät juurikaan aiheuta ongelmia, jos testiaine voidaan tunnistaa analyyttisesti ja erottaa epäpuhtauksista.

Menetelmä on validoitu lisäyksessä olevassa taulukossa 1 luetelluille aineille. Sitä sovellettiin myös useille muille kemikaaleille, jotka kuuluivat seuraaviin kemiallisiin luokkiin:

— aromaattiset amiinit (esim. trifluraliini, 4-kloorianiliini, 3,5-dinitroaniliini, 4-metyylianiliini, N-metyylianiliini, 1-naftyyliamiini)

— aromaattiset karboksyylihappoesterit (esim. bentsoehappometyyliesteri, 3,5-dinitrobentsoehappometyyliesteri)

— aromaattiset hiilivedyt (esim. tolueeni, ksyleeni, etyylibentseeni, nitrobentseeni)

— aryylioksifenoksipropionihappoesterit (esim. diklofoppi-metyyli, fenoksaproppi-etyyli, fenoksaproppi-P-etyyli)

— bentsimidatsoli- ja imidatsolifungisidit (esim. karbendatsiimi, fuberidatsoli, triatsoksidi)

— karboksyylihappoamidit (esim. 2-klooribentsamidi, N,N-dimetyylibentsamidi, 3,5-dinitrobentsamidi, N-metyylibentsamidi, 2-nitrobentsamidi, 3-nitrobentsamidi)

— klooratut hiilivedyt (esim. endosulfaani, DDT, heksaklooribentseeni, kvintotseeni, 1,2,3-triklooribentseeni)

— orgaanisia fosforiyhdisteitä sisältävät torjunta-aineet (esim. atsinfossi-metyyli, disulfotoni, fenamifossi, isofenfossi, pyratsofossi, sulprofossi, triatsofossi)

— fenolit (esim. fenoli, 2-nitrofenoli, 4-nitrofenoli, pentakloorifenoli, 2,4,6-trikloorifenoli, 1-naftoli)

— tenyyliurea-johdannaiset (esim. isoproturoni, monolinuroni, pensykuroni)

— väriaineet (esim. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81)

— polyaromaattiset hiilivedyt (esim. asenafteeni, naftaleeni)

— 1,3,5-triatsiinia sisältävät kasvinsuojeluaineet (esim. prometryyni, propatsiini, simatsiini, terbutryyni)

— triatsolijohdannaiset (esim. tebukonatsoli, triadimefoni, tradimenoli, triapentenoli).

Menetelmä ei sovellu aineille, jotka reagoivat joko eluentin tai stationaarifaasin kanssa. Se ei myöskään sovellu aineille, jotka reagoivat spesifisellä tavalla epäorgaanisten yhdisteiden kanssa (jos esim. muodostuu klusterikomplekseja saven mineraalien kanssa). Menetelmä ei mahdollisesti sovellu myöskään pinta-aktiivisille aineille, epäorgaanisille yhdisteille eikä vahvoille tai melko vahvoille hapoille ja emäksille. Välillä 1,5 - 5,0 olevia log K_{oc}-arvoja voidaan määrittää. Ionisoituvat yhdisteet on määritettävä käyttäen puskuroitua liikkuvaa faasia, mutta on varottava, etteivät puskurin sisältämät aineet tai testiaine saostu.

▼B

1.6 LAATUVAATIMUKSET

1.6.1 **Tarkkuus**

Testiaineen adsorptiokerroin voidaan tavallisesti arvioida ± 0,5 logaritmiyksikön tarkkuudella verrattuna erätasapainomenetelmällä määritettyyn arvoon (ks. lisäyksessä oleva taulukko 1). Suurempaan tarkkuuteen voidaan päästä, jos vertailuaineet ovat rakenteellisesti testiaineen kaltaisia.

1.6.2 **Toistettavuus**

Määritykset olisi tehtävä vähintään kaksoismäärityksinä. Yksittäisistä mittauksista lasketut log K_{oc}-arvot eivät saisi erota toisistaan enemmän kuin 0,25 logaritmiyksikköä.

1.6.3 **Uusittavuus**

Menetelmää sovellettaessa saadut kokemukset tukevat käsitystä menetelmän validiteetista. Kun HPLC-menetelmää tutkittiin 48 aineella (enimmäkseen torjunta-aineita), joista oli saatavilla luotettavia maaainesten K_{oc}:tä koskevia tietoja, saatiin korrelaatiokertoimeksi R = 0,95 (10) (11).

Menetelmän parantamiseksi ja validoimiseksi tehtiin laboratorioiden välinen vertailukoe, johon osallistui 11 laboratoriota (12). Tulokset esitetään lisäyksessä olevassa taulukossa 2.

1.7 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.7.1 **Adsorptiokertoimen alustava määritys**

Oktanoli-vesijakautumiskerrointa P_{ow} (= K_{ow}) ja (jossain määrin) vesiliukoisuutta voidaan käyttää osoittamaan adsorption määrää erityisesti ionisoitumattomille yhdisteille, ja siten sen avulla voidaan alustavasti määrittää kyseeseen tuleva mittausalue. Useille kemikaaliryhmille on julkaistu useita käyttökelpoisia korrelaatioita (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2 **Laitteet**

Menetelmässä tarvitaan nestekromatografi, jossa on pulssittomasti toimiva pumppu ja sopiva detektori. On suositeltavaa käyttää injektioventtiiliä ja injektiosilmukkaa. Pylvään pakkausaineena on käytettävä kaupallista kemiallisesti sidottua silikapohjaista syaanopropyylihartsia (esim. Hypersil ja Zorbax CN). Samaa ainetta oleva esipylväs voidaan liittää injektiojärjestelmän ja analyyttisen pylvään väliin. Eri valmistajien pylväiden erotustehot voivat erota huomattavasti toisistaan. Ohjeellisesti pitäisi pyrkiä seuraavanlaisiin kapasiteettikertoimiin k': log k' > 0,0, kun log K_{oc} = 3,0 ja log k' > -0,4, kun log K_{oc} = 2,0 käytettäessä metanoli/vesiseosta (55/45 %) liikkuvana faasina.

1.7.3 **Liikkuva faasi**

Useita liikkuvia faaseja on testattu, ja seuraavia kahta suositetaan:

— metanoli/vesi (55/45 % v/v)

— metanoli/0,01 M sitraattipuskuri, pH 6,0 (55/45 % v/v)

▼B

Eluutioliuoksen valmistukseen on käytettävä HPLC-laatuista metanolia ja tislattua vettä tai sitraattipuskuria. Seoksesta poistetaan kaasut ennen käyttöä. Eluution pitäisi olla isokraattinen. Jos metanoli-vesiseokset eivät sovellu, voidaan kokeilla muita orgaanisen liuottimen ja veden seoksia, esim. etanoli-vesi- tai asetonitriili-vesiseoksia. Ionisoituville yhdisteille suositetaan puskuriliuoksen käyttöä pH:n pitämiseksi vakiona. Suolan saostumista ja pylvään suoritustehon heikentymistä on pyrittävä välttämään. Se voi tapahtua käytettäessä tiettyjä orgaanisia faaseja ja puskuriseoksia.

Mitään sellaisia lisäaineita kuten ioniparireagensseja ei saa käyttää, koska ne voivat vaikuttaa stationaarifaasin sorptio-ominaisuuksiin. Tällaiset stationaarifaasin muutokset voivat olla palautumattomia. Siksi kokeet, joissa käytetään lisäaineita, on ehdottomasti tehtävä eri pylväillä.

1.7.4 **Liuotetut aineet**

Testi- ja vertailuaine olisi liuotettava liikkuvaan faasiin.

1.8 TESTIN SUORITUSTEHO

1.8.1 **Testiolosuhteet**

Lämpötila olisi rekisteröitävä mittausten aikana. Suositellaan, että käytetään termostoitua pylvästä, jotta voidaan varmistaa vakio-olosuhteet kalibrointimittausten ja alustavien ajojen sekä testiaineen määritysten aikana.

1.8.2 **Kuollut aika t_o**

Kuollut aika t_o voidaan määrittää kahdella eri menetelmällä (ks. myös jakso 1.2).

1.8.2.1 *Kuolleen ajan t_o määritys homologisen sarjan avulla*

Tämän menetelmän on osoitettu antavan luotettavia ja vakioituja t_o-arvoja. Menetelmä selostetaan yksityiskohtaisesti testimenetelmässä A.8: Partitiokerroin (n-oktanoli/vesi), HPLC-menetelmä.

1.8.2.2 *Kuolleen ajan t_o määritys inerteillä aineilla, jotka eivät tartu pylvääseen*

Tämä menetelmä perustuu formamidi-, urea- tai natriumnitraattiliuosten injektoimiseen. Määritykset olisi tehtävä vähintään kaksoismäärityksinä.

1.8.3 **Retentioaikojen t_R määritys**

Vertailuaineet olisi valittava kuten jaksossa 1.3 selostetaan. Ne voidaan injektoida seosstandardina retentioaikojen määrittämiseksi, mikäli on vahvistettu, että toisten vertailuaineiden läsnäolo ei vaikuta yksittäisten vertailuaineiden retentioaikoihin. Kalibrointi olisi tehtävä säännöllisin väliajoin vähintään kahdesti päivässä, jotta pylväiden mahdolliset suorituskyvyn muutokset voidaan selittää. Kalibrointiajot olisi tehtävä mieluiten ennen testiaineen injektioita ja niiden jälkeen, jotta voidaan varmistaa, etteivät retentioajat ole muuttuneet. Testiaineet injektoidaan erikseen mahdollisimman pieninä määrinä (pylvään ylikuormituksen estämiseksi), ja niiden retentioajat määritetään.

▼B

Määritysten luotettavuuden lisäämiseksi olisi tehtävä vähintään kaksoismääritykset. Yksittäisistä mittauksista lasketut log K_{oc}-arvot eivät saisi erota toisistaan enemmän kuin 0,25 logaritmiyksikköä.

1.8.4 **Arviointi**

Kapasiteettikertoimet k' lasketaan valittujen vertailuaineiden kuolleesta ajasta t_o ja retentioajoista t_R yhtälön 4 avulla (ks. jakso 1.2). Laaditaan kuvaaja, jossa esitetään vertailuaineiden log k' -arvot erätasapainokokeesta saatujen, lisäyksen taulukoissa 1 ja 3 esitettyjen vertailuaineita koskevien log K_{oc} -arvojen funktiona. Testiaineen log K_{oc} -arvo määritetään sen log k' -arvon perusteella kyseisen kuvaajan avulla. Jos testiaineen log K_{oc} osoittautuu todellisten tulosten perusteella olevan kalibrointialueen ulkopuolella, testi olisi toistettava käyttäen sopivampia vertailuaineita.

2. **MITTAUSTULOKSET JA TESTISELOSTEET**

Testiselosteessa on esitettävä tai selostettava seuraavat asiat:

— testiaineiden ja vertailuaineiden tunnistetiedot ja niiden puhtaus sekä pK_a-arvot tarvittaessa,

— laitteet ja toimintaolosuhteet, esim. analyyttisen (ja esi-) pylvään tyyppi ja mitat, detektiomenetelmä, liikkuva faasi (ainesten suhteelliset osuudet ja pH), lämpötila-alue mittausten aikana,

— kuollut aika ja sen määrittämiseen käytetty menetelmä,

— pylvääseen injektoitujen testiaineiden ja vertailuaineiden määrät,

— kalibrointiin käytettyjen vertailuaineiden retentioajat,

— sovitettua regressiokuvaajaa (log k' vs log K_{oc}) koskevat tiedot ja itse kuvaaja,

— testatun yhdisteen keskimääräinen retentioaika ja estimoitu d log K_{oc}-arvo,

— kromatogrammit.

3. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chapt. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 167.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35-(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996).Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Muller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

LISÄYS

Taulukko 1

Maa-ainesten ja viemärilietteiden K_{oc}-arvojen ja kartoittavan HPLC menetelmän perusteella laskettujen arvojen vertailu ([1]) ([2])

Aine	CAS-nro	Log K_{oc} viemäriliet-teet	Log K_{oc} HPLC	Δ	Log K_{oc} maa-ainek-set	Log K_{oc} HPLC	Δ
Atratsiini	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuroni	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fentioni	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuroni	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreeni	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Bentsoehappofenyyliesteri	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Bentsamidi	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobcntsamidi	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Asetanilidi	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniliini	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dikloorianiliini	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), s. 121–128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), s. 107–119.

Taulukko 2

Tulokset 11 laboratorion välisestä vertailusta, jonka tarkoituksena oli parantaa ja validoida HPLC-menetelmä ([1])

Aine	CAS-nro	log K_{oc}	K_{oc}	log K_{oc}
		[OECD 106]	[HPLC-menetelmä]	
Atratsiini	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuroni	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenoli	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuroni	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fentioni	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), s. 1373–1384.

▼B

Taulukko 3

Kartoittavaan HPLC-menetelmään suositellut vertailuaineet; tiedot perustuvat maa-ainesten adsorptiotuloksiin

Vertailuaine	CAS-nro	Erätasapainosta saadut log K_{oc} -arvojen keskiarvot	K_{oc} -tulosten lukumäärä	Log S.D.	Lähde
Asetanilidi	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Fenoli	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-Nitrobentsamidi	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N, N-Dimetyylibentsamidi	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-Metyylibentsamidi	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Metyylibentsoaatti	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
Atratsiini	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
Isoproturoni	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-Nitrobentsamidi	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Aniliini	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-Dinitrobentsamidi	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Karbendatsiimi	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenoli	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triatsoksidi	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triatsofossi	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linuroni	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naftaleeni	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfaani-dioli	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Metiokarbi	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-Triklooribentseeni	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Fentioni	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
Pyratsofossi	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
α-Endosulfaani	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diklofoppi-metyyli	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
Fenantreeni	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (seos)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50-29-3	5,63	1	—	[b]

[a] W. Kördel. J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01 044 (1994).
[b] B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22. s. 285–304.
[c] Data provided by industry.

▼B

C.20. **LISÄÄNTYMISTESTI VESIKIRPULLA (*DAPHNIA MAGNA*)**

1. **MENETELMÄ**

Tämä lisääntymismyrkyllisyyden testimenetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta TG 211 (1998).

1.1 JOHDANTO

Testin pääasiallinen tarkoitus on määrittää kemikaalien vaikutus vesikirpun lisääntymistuotokseen.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Emoeläimet: Naarasvesikirput, jotka ovat mukana testin alussa ja joiden lisääntymistuotos määritetään.

Jälkeläiset: Nuoret vesikirput, joita emoeläimet tuottavat testin aikana.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): Pienin testipitoisuus, jolla aineen havaitaan aiheuttavan tilastollisesti merkittävän vaikutuksen (todennäköisyystasolla $p < 0,05$) lisääntymiseen ja emokuolleisuuteen kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla. Kaikilla LOEC:tä suuremmilla testipitoisuuksilla on kuitenkin oltava vähintään yhtä suuri haittavaikutus kuin LOEC-tasolla havaittu vaikutus. Jos nämä kaksi eivät täyty, on annettava täydellinen selitys siitä, miten LOEC (ja myös NOEC) on valittu.

NOEC (No Observed Effect Concentration): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkittävää vaikutusta (todennäköisyystasolla $p < 0,05$).

$\mathbf{EC_X}$: Veteen liuotetun testiaineen pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin laskun vesikirpun lisääntymisessä tietyllä altistusajanjaksolla.

Ominaiskasvu: Populaation kasvu, jossa yhdentyvät lisääntyminen ja ikäspesifinen kuolleisuus (20) (21) (22). Dynaamisessa tasapainossa olevassa populaatiossa ominaiskasvu on nolla. Suurenevissa populaatioissa se on positiivinen ja pienenevissä negatiivinen. Negatiivinen arvo johtaa luonnollisesti lopulta populaation häviämiseen.

Osoittamisraja: Pienin pitoisuus, joka voidaan osoittaa, mutta ei mitata kvantitatiivisesti.

Määritysraja: Pienin pitoisuus, joka voidaan mitata kvantitatiivisesti.

Kuolleisuus: Eläin katsotaan kuolleeksi, kun se ei liiku, ts. ei pysty uimaan tai sen raajoissa tai takaruumiissa ei havaita mitään liikettä sen jälkeen kun testiastiaa on ravisteltu varovasti 15 sekuntia. (Jos käytetään muuta määritelmää, se on ilmoitettava testiselosteessa ja sille on annettava lähdeviite.)

▼B

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Nuoria naarasvesikirppuja (emot), joiden ikä on alle 24 tuntia testin alussa, altistetaan testiaineelle, jota on lisätty veteen useissa pitoisuuksissa. Testin kesto on 21 vuorokautta. Testin lopussa määritetään vielä testin lopussa elossa olevien emojen tuottamien elävien jälkeläisten kokonaismäärä. Tämä tarkoittaa sitä, että testin aikana kuolleiden aikuisten tuottamia poikasia ei sisällytetä tulokseen. Emojen lisääntymistuotos voidaan ilmaista muillakin tavoin (esim. elävien jälkeläisten määrä eläintä kohti päivässä siitä päivästä lähtien, jolloin jälkeläisiä havaittiin ensimmäisen kerran), mutta nämä pitäisi ilmoittaa testin lopussa elossa olevien emojen tuottamien elävien jälkeläisten kokonaismäärän lisäksi. Testiaineelle altistettujen eläinten lisääntymistuotosta verrataan kontrolli(e)n tuotokseen LOEC:n määrittämiseksi ja siten myös NOEC:n määrittämiseksi. Tuloksia analysoidaan lisäksi mahdollisuuksien mukaan regressiomenetelmällä sellaisen pitoisuuden arvioimiseksi, joka aiheuttaisi x prosentin laskun lisääntymistuotoksessa (ts. EC_{50}, EC_{20} tai $EC_{10)}$).

Myös emojen eloonjääminen ja ensimmäisten sikiöiden tuottamisen ajankohta on ilmoitettava. Muita testiaineeseen liittyviä, esim. kasvuun (pituus) ja mahdollisesti lisääntymisen ominaisnopeuteen kohdistuvia vaikutuksia voidaan tutkia.

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Vesikirpulla tehdyn välittömän myrkyllisyyden testin tulokset (ks. menetelmä C.2, osa I) pitäisi olla saatavilla. Tuloksesta voi olla hyötyä valittaessa lisääntymistestiin sopivaa testipitoisuusaluetta. Testiaineen vesiliukoisuuden ja höyrynpaineen pitäisi olla tiedossa, ja aineen määrittämiseksi testiliuoksissa pitäisi olla käytettävissä luotettava analyyttinen menetelmä, jonka avulla voidaan ilmoittaa myös saantoteho ja määritysraja.

Sellaisia tietoja, joista voi olla hyötyä testiolosuhteiden määrittelemisessä, ovat mm. rakennekaava, aineen puhtaus, stabiilisuus valossa, stabiilisuus testiolosuhteissa, pKa, P_{ow}. ja helpon biohajoavuuden testin (ks. menetelmä C.4) tulokset.

1.5 TESTIN LUOTETTAVUUS

Jotta testi olisi luotettava, kontrolli(e)n pitäisi täyttää seuraavat kriteerit:

— emojen (naarasvesikirppujen) kuolleisuus on enintään 20 % testin lopussa,

— testin lopussa elossa olevan emon tuottamia eläviä jälkeläisiä on keskimäärin vähintään 60.

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Laitteisto**

Astioiden ja muiden laitteiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Testiastiat ovat tavallisesti lasisia dekantterilaseja.

Lisäksi tarvitaan joitakin tai kaikkia seuraavista laitteista:

— happimittari (joka on varustettu mikroelektrodilla tai muulla sopivalla laitteella, jolla voidaan mitata liuennut happi pienitilavuuksisissa näytteissä),

▼B

— asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön,

— pH-mittari,

— laitteet veden kovuuden mittaamiseen,

— laitteet veden orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuuden (TOC) mittaamiseen tai kemiallisen hapenkulutuksen (COD) mittaamiseen,

— asianmukaiset laitteet valojärjestelmän ja valon intensiteetin säätöön.

1.6.2 **Testiorganismi**

Testissä olisi käytettävä *Daphnia magna* Straus -organismia. Muita vesikirppulajeja saa käyttää, jos ne täyttävät asianmukaiset vaatimukset (kontrollien lisääntymistuottavuutta koskevan vaatimukset pitäisi olla ominainen kyseiselle vesikirppulajille). Jos käytetään muita vesikirppulajeja, niiden täytyy olla selvästi tunnistettuja ja niiden käytön perusteltua.

Klooni olisi mieluiten tunnistettava genotyypin määrityksellä. Tutkimuksissa (1) on osoitettu, että kloonin A (joka on peräisin IRC-HA:sta Ranskasta) (3) lisääntymistuottavuus täyttää jatkuvasti vaatimuksen, jonka mukaan tässä menetelmässä kuvatuissa olosuhteissa tuotto on keskimäärin vähintään 60 jälkeläistä kutakin elävää emoa kohti. Muutkin kloonit ovat kuitenkin hyväksyttäviä, jos vesikirppuviljelmän osoitetaan täyttävän testiä koskevan validiteettiperusteen.

Testin alussa eläinten on oltava alle 24 tunnin ikäisiä, eivätkä ne saa olla ensimmäistä sikiösarjaa. Niiden olisi oltava peräisin terveestä varastokannasta (ts. niissä ei saa näkyä merkkejä stressistä kuten korkeaa kuolleisuutta, koiraita ja lepomunia, viivästymistä ensimmäisten sikiöiden tuottamisessa, värihäiriöisiä eläimiä jne.). Varastokannan eläimiä on pidettävä samanlaisissa viljelyoloissa (valo, lämpötila, viljelyneste, ravinto ja eläinten määrä tilavuusyksikköä kohti) kuin testissä käytettäviä. Jos testissä käytettävä viljelyneste eroaa vesikirpun viljelyssä normaalisti käytetystä viljelynesteestä, on hyvä noudattaa käytäntöä, että eläimet totutetaan viljelyoloihin ennen testiä noin kolmen viikon ajan (ts. yhden sukupolven ajan), jotta emojen stressaantuminen vältettäisiin.

1.6.3 **Testissä käytettävä viljelyneste**

Testiin suositellaan täysin määriteltyä viljelynestettä. Siten voidaan välttää sellaisten lisäaineiden (esim. levät, maaperäuute) käyttö, joiden ominaisuuksia ei voida hallita täydellisesti, ja parannetaan siten mahdollisuuksia laboratorioiden väliseen vakiointiin. Elendtin M4- (4) ja M7-viljelynesteet (ks. lisäys 1) on todettu sopiviksi tähän tarkoitukseen. Muitakin viljelynesteitä (esim. (5) (6)) voidaan käyttää, jos vesikirppuviljelmän osoitetaan täyttävän testiä koskevan validiteettiperusteen.

Jos käytetään viljelynestettä, jossa on kemiallisesti määrittelemättömiä lisäaineita, lisäaineet on spesifioitava selvästi ja testiselosteessa on annettava tietoa niiden koostumuksesta, erityisesti hiilipitoisuudesta, koska se voi vaikuttaa annettavaan ravintoon. Suositellaan, että orgaanisen lisäaineen varastovalmisteen orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) ja/tai kemiallinen hapenkulutus (COD) määritetään ja valmisteen vaikutus testissä käytettävän viljelynesteen TOC- ja/tai COD-arvoihin arvioidaan. Viljelynesteen TOC-tason olisi oltava (ennen levien lisäämistä) alle 2 mg/l (7).

▼B

Kun testataan metalleja sisältäviä aineita, on tärkeää ottaa huomioon, että testissä käytettävän viljelynesteen ominaisuudet (esim. kovuus, kelaatiokyky) voivat vaikuttaa testiaineen myrkyllisyyteen. Tästä syystä on toivottavaa käyttää kemiallisesti määriteltyä viljelynestettä. Tällä hetkellä kuitenkin ainoat kemiallisesti määritellyt viljelynesteet, joiden tiedetään sopivan *Daphnia magnan* pitkäaikaiseen viljelyyn, ovat Elendtin M4 ja M7. Molemmissa viljelynesteissä on kelatoivaa ainetta EDTA:ta. On osoitettu (2), että kadmiumin ”näennäinen myrkyllisyys” on yleensä pienempi, kun testi tehdään M4- ja M7-viljelynestcessä kuin nesteessä, joka ei sisällä EDTA:ta. M4- ja M7-viljelynesteitä ei siksi suositella metalleja sisältävien aineiden testaukseen, ja myös muita viljelynesteitä, joissa on tunnettuja kelatoivia aineita, olisi vältettävä. Metalleja sisältäville aineille voi olla suositeltavaa käyttää jotain muuta viljelynestettä, esimerkiksi ASTM:n rekonstituoitua kovaa makeaa vettä (7), joka ei sisällä EDTA:ta ja johon on lisätty leväuutetta (8). Tämä ASTM:n kovan makean veden ja leväuutteen yhdistelmä sopii myös vesikirpun pitkäaikaiseen viljelyyn ja testaukseen (2), vaikka sillä on vielä lievä kelatoiva vaikutus, joka johtuu lisätyn leväuutteen orgaanisista aineista.

Testin alussa ja sen aikana liuenneen hapen pitoisuuden olisi oltava yli 3 mg/l. pH:n olisi oltava välillä 6-9, eikä se saisi yleensä vaihdella enemmän kuin 1,5 yksikköä testin aikana. Kovuudeksi suositellaan yli 140 mg/l (ilmaistuna $CaCO_3$:na). Tällä ja suuremmalla pitoisuudella tehdyissä testeissä on osoitettu validiteettiperusteiden mukaista lisääntymistuottavuutta (9) (10).

1.6.4 **Testiliuokset**

Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan yleensä laimentamalla varastoliuosta. Varastoliuokset olisi mieluiten tehtävä liuottamalla aine testissä käytettävään viljelynesteeseen.

Orgaanisia liuottimia tai dispergointiaineita voidaan tarvita joissakin tapauksissa sopivan väkevyisen varastoliuoksen valmistamiseksi, mutta tällaisten aineiden käyttöä olisi vältettävä. Sopivia liuottimia ovat esim. asetoni, etanoli, metanoli, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sopivia dispergointiaineita ovat esim. Cremophor RH40, 0,01-prosenttinen metyyliselluloosa ja HCO-40. Missään tapauksessa testiaineen pitoisuus testi-liuoksissa ei saa ylittää aineen liukoisuusrajaa testissä käytettävässä viljelynesteessä.

Liuottimia käytetään sellaisen varastoliuoksen valmistamiseksi, joka voidaan annostella veteen tarkasti. Edellä mainitut liuottimet eivät ole myrkyllisiä eivätkä lisää aineen vesiliukoisuutta siinä pitoisuudessa, jota liuottimelle suositellaan lopullisessa testissä käytettävässä viljelynesteessä (ts. $\leq$ 0,1 ml/l).

Dispergointiaineet voivat helpottaa tarkkaa annostelua ja dispergointia. Edellä mainitut dispergointiaineet eivät ole myrkyllisiä eivätkä lisää aineen vesiliukoisuutta siinä pitoisuudessa, jota dispergointiaineelle suositellaan lopullisessa testissä käytettävässä viljelynesteessä (ts. $\leq$ 0,1 ml/l).

▼B

1.7 TESTIN SUUNNITTELU

Testiaineet jaetaan testiastioihin, joita on tämän jälkeen käsiteltävä satunnaistetusti. Jollei satunnaisteta, saattaa tästä johtua systemaattinen virhe, joka voidaan tulkita pitoisuudesta aiheutuvaksi vaikutukseksi. Erityisesti jos koeastioita käsitellään annostelu- tai pitoisuusjärjestyksessä, saattaa jokin aikaan liittyvä tekijä, kuten työntekijän väsymys tai muu virhe, aiheuttaa voimakkaampia vaikutuksia suuremmilla pitoisuuksilla. Jos lisäksi olosuhteet testin alussa tai ympäristöolosuhteet, kuten sijoituspaikka laboratoriossa, saattavat vaikuttaa testituloksiin, olisi harkittava testin eristämistä.

1.8 TESTIN SUORITUS

1.8.1 **Altistumisolosuhteet**

1.8.1.1 *Testin kesto*

Testin kesto on 21 vuorokautta.

1.8.1.2 *Vesikirppujen määrä testiastiassa*

Emoja pidetään testiastiassa yksi eläin astiaa kohti. Astiaan pannaan 50-100 ml viljelynestettä.

Suurempi tilavuus voi olla joskus tarpeen testiaineen pitoisuuden määritykseen käytettävän analyyttisen menetelmän vaatimusten vuoksi, vaikka rinnakkaisnäytteet voidaan myös yhdistää kemiallista analyysiä varten. Jos tilavuus on yli 100 ml, vesikirpulle annettavaa annosta on ehkä suurennettava, jotta varmistetaan ravinnon riittävyys ja validiteettiperusteiden noudattaminen. Läpivirtaustesteille voidaan harkita muunlaisia suoritustapoja teknisistä syistä (esimerkiksi neljä 10 vesikirpun ryhmää suuressa testitilavuudessa), mutta kaikki muutokset testin suunnittelussa on kirjattava.

1.8.1.3 *Eläinten lukumäärä*

Puolistaattisissa oloissa tehtävässä testissä on oltava vähintään 10 yksittäin kasvatettua vesikirppua kutakin testipitoisuutta kohti ja vähintään 10 yksittäin pidettyä vesikirppua kontrollisarjassa.

Läpivirtaustesteissä 40 vesikirppua neljään 10 vesikirpun ryhmään jaettuna on osoittautunut sopivaksi (1). Pienempääkin määrää eläimiä voi käyttää. Suositellaan vähintään 20:tä vesikirppua pitoisuutta kohti jaettuna kahdeksi tai useammaksi yhtä monta vesikirppua käsittäväksi rinnakkaisnäytteeksi (esim. neljä rinnakkaista, joista kussakin viisi vesikirppua). On huomattava, että jos vesikirppuja kasvatetaan ryhminä, lisääntymistuotosta ei voi ilmaista elävien jälkeläisten kokonaismääränä testin lopussa elossa olevia emoja kohti, jos emoja kuolee. Tällöin lisääntymistuotos olisi ilmaistava elävien jälkeläisten kokonaismääränä testin alussa mukana olevia emoja kohti.

1.8.1.4 *Ruokkiminen*

Puolistaattisissa oloissa tehtävässä testissä vesikirppuja olisi ruokittava mieluiten joka päivä mutta ainakin kolmesti viikossa (ts. silloin kun viljelyneste vaihdetaan). Jos tästä poiketaan (esim. läpivirtaustestissä), siitä olisi ilmoitettava.

▼B

Testin aikana emojen ruokavalion pitäisi koostua mieluiten seuraavien lajien (yhden tai useamman) elävistä levistä: *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* (nykyisin *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) ja *Scenedesmus subspicatus*. Ruokavalion pitäisi perustua siihen orgaanisen hiilen (C) määrään, joka on annettava kullekin emolle. Tutkimuksissa (12) on osoitettu, että annokset 0,1 - 0,2 mg C/vesikirppu/vrk riittävät vesikirpulla siihen, että jälkeläisiä saadaan riittävä määrä, jotta testin validiteettiperusteet täyttyvät. Ravintoannos voidaan annostella joko vakionopeudella koko testin ajan tai haluttaessa voidaan alussa käyttää alhaisempaa nopeutta, jota lisätään testin aikana emojen kasvun huomioon ottamiseksi. Tällöinkin annoksen on pysyttävä samana suositellulla alueella 0,1 - 0,2 mg C/vesikirppu/vuorokausi koko testin ajan.

Jos käytetään muita menetelmiä (kuten leväsolujen määrää tai valon absorptiota) vaaditun ravintoannoksen määrittämiseksi esimerkiksi siksi, että hiilipitoisuuden määritys on aikaa vievää, laboratorioiden on laadittava omat nomogramminsa, josta saadaan leväviljelmän hiilipitoisuus (ks. lisäys 2, ohjeet nomogrammien laatimiseksi). Nomogrammit olisi tarkistettava vähintään kerran vuodessa ja useamminkin, jos levien viljelyolosuhteet muuttuvat. On havaittu että valon absorptio on parempi menetelmä hiilipitoisuuden määrittämiseksi kuin solumäärä (1 3).

Vesikirpulle olisi annettava ravinnoksi konsentroitua leväsuspensiota, jotta testiastioihin lisätyn levänviljelynesteen tilavuus olisi mahdollisimman pieni. Leviä voidaan konsentroida sentrifugoimalla, jonka jälkeen ne suspendoidaan uudelleen veteen, deionisoituun veteen tai vesikirpun viljelynesteeseen.

1.8.1.5 *Valo*

16 tuntia valoa, jonka intensiteetti on enintään 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

1.8.1.6 *Lämpötila*

Testissä käytettävän viljelynesteen lämpötilan on oltava 18-22 °C. Lämpötila ei saisi kuitenkaan, jos mahdollista, vaihdella missään testissä enempää kuin 2 °C kyseisissä rajoissa (esim. 18-20, 19-21 tai 20-22 °C). Lämpötilan seuraamista varten voi olla tarpeen lisätä yksi testiastia.

1.8.1.7 *Ilmastus*

Testiastioita ei saa ilmastaa testin aikana.

1.8.2 **Testipitoisuudet**

Kokeessa pitäisi olla yleensä vähintään viisi testipitoisuutta geometrisessa sarjassa, eikä kerroin saisi olla suurempi kuin 3,2. Kutakin pitoisuutta kohti olisi käytettävä asianmukaista rinnakkaisnäytteiden määrää, (ks. kohta 1.8.1.3). Jos pitoisuuksien määrä on vähemmän kuin viisi, se on perusteltava. Aineita ei saisi testata niiden liukoisuusrajaa suuremmassa pitoisuudessa.

▼B

Pitoisuusalueen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

i) Jos tarkoitus on määrittää LOEC/NOEC, pienimmän testipitoisuuden on oltava niin pieni, ettei hedelmällisyys tällä pitoisuudella ole merkitsevästi pienempi kuin kontrollilla. Mikäli näin ei ole, testi on toistettava vielä pienemmällä pitoisuudella.

ii) Jos tarkoitus on määrittää LOEC/NOEC, suurimman testipitoisuuden on oltava niin suuri, että hedelmällisyys tällä pitoisuudella on merkitsevästi pienempi kuin kontrolleilla. Mikäli näin ei ole, testi on toistettava suuremmalla pitoisuudella.

iii) Jos arvioidaan EC_X lisääntymisvaikutuksille, suositellaan, että käytetään niin suurta määrää pitoisuuksia, että EC_X voidaan määrittää asianmukaisella luotettavuustasolla. Jos arvioidaan EC_{50} lisääntymisvaikutuksille, suositellaan, että suurin testipitoisuus on suurempi kuin kyseinen EC_{50}. Muuten EC_{50}:n luottamusväli on kovin suuri ja voi olla mahdotonta arvioida tyydyttävästi sovitetun mallin asianmukaisuutta, vaikka onkin mahdollista arvioida EC_{50}.

iv) Testipitoisuuden joukossa ei saisi olla sellaista pitoisuutta, jolla olisi tilastollisesti merkitsevä vaikutus täysikasvuisten eläinten eloonjäämiseen, koska testi ei silloin olisi enää pelkästään lisääntymistesti, vaan yhdistetty lisääntymis- ja kuolleisuustesti, joka vaatisi paljon monimutkaisempaa tilastollista analyysiä.

Aikaisemmat tiedot testiaineen myrkyllisyydestä (esim. välittömän myrkyllisyyden testistä ja/tai alustavista pitoisuuskartoitustesteistä saadut tiedot) auttanevat sopivien testipitoisuuksien valitsemisessa.

Jos testiliuosten valmistuksessa käytetään liuottimia tai dispergointiaineita (ks. kohta 1.6.4), niiden lopullinen pitoisuus testiastioissa saisi olla enintään 0,1 ml/l, ja sen olisi oltava sama kaikissa testiastioissa.

1.8.3 **Kontrollit**

Testisarjan lisäksi on määritettävä yksi viljelynestettä sisältävä kontrollisarja ja tapauksen mukaan yksi kontrollisarja. joka sisältää liuotinta tai dispergointiainetta. Mahdollisen liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuuden olisi oltava sama kuin testiainetta sisältävissä testiastioissa. Riittävä määrä rinnakkaisnäytteitä olisi määritettävä (ks. kohta 1.8.1.3).

Yleensä hyvin suoritetussa testissä kontrollinäytteiden emojen tuottamien elävien jälkeläisten määrän keskiarvon vaihtelukerroin saisi olla enintään 25 %, ja tämä olisi ilmoitettava testeille, joissa käytetään yksittäin kasvatettuja eläimiä.

1.8.4 **Testissä käytettävän viljelynesteen vaihto**

Viljelynesteen vaihtoväli riippuu testiaineen stabiilisuudesta. mutta viljelyneste pitäisi vaihtaa vähintään kolme kertaa viikossa. Jos testiainepitoisuus alustavien testien perusteella (ks. kohta 1.4) ei ole stabiili (ts. ei ole välillä 80-120 % nimellispitoisuudesta tai laskee alle 80 prosentin mitatusta alkupitoisuudesta) pisimmän hyväksytyn vaihtovälin aikana (ts. 3 vrk), olisi harkittava viljelynesteen vaihtamista useammin tai siirtymistä läpivirtaustestiin.

▼B

Kun viljelyneste vaihdetaan puolistaattisessa testissä, valmistetaan toinen sarja testiastioita ja emovesikirput siirretään niihin esim. sopivan kokoisella lasipipetillä. Vesikirpun kanssa siirrettävän viljelynesteen tilavuuden pitäisi olla mahdollisimman pieni.

1.8.5 **Havainnot**

Testin aikana tehtyjen havaintojen tulokset olisi kirjattava testilomakkeille (ks. lisäys 3 ja 4). Jos on tehtävä muita mittauksia (ks. 1.3 ja 1.8.8), on ehkä tehtävä lisähavaintoja.

1.8.6 **Jälkeläiset**

Kunkin emon tuottamat jälkeläiset olisi mieluiten otettava astiasta ja laskettava päivittäin ensimmäisistä jälkeläisistä lähtien, jotta ne eivät söisi aikuisille tarkoitettua ravintoa. Tässä testissä tarvitsee laskea vain elävät jälkeläiset, mutta kuolleiden munien tai poikasten esiintyminen olisi kirjattava.

1.8.7 **Kuolleisuus**

Emojen kuolleisuus olisi kirjattava mieluiten päivittäin tai ainakin silloin, kun poikaset lasketaan.

1.8.8 **Muut muuttujat**

Vaikka tämän menetelmän pääasiallisena tarkoituksena on lisääntymisvaikutusten arviointi, on mahdollista, että muitakin vaikutuksia esiintyy siinä määrin, että ne voidaan analysoida tilastollisesti. Kasvumittaukset ovat hyvin toivottavia, koska niistä saa mahdollisia subletaaleja vaikutuksia koskevia tietoja, jotka voivat olla hyödyllisempiä kuin pelkästään lisääntymisen määrittäminen. Emojen pituuden (ts. pituus ilman pyrstörankaa) mittausta testin lopussa suositellaan. Muita muuttujia, jotka voidaan mitata tai laskea, ovat esim. emon ikä ensimmäisten (ja myöhempien) jälkeläisten syntyessä, jälkeläisten lukumäärä ja koko, ennenaikaisesti syntyneiden jälkeläisten määrä, koiraiden tai lepomunien esiintyminen sekä populaation ominaiskasvunopeus.

1.8.9 **Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus**

Happipitoisuus, lämpötila, veden kovuus ja pH olisi mitattava vähintään kerran viikossa sekä tuoreesta että vanhasta viljelynesteestä, kontroll(e)ista ja testistä, jossa on suurin testiaineen pitoisuus.

Testin aikana testiaineen pitoisuus määritetään säännöllisin väliajoin.

Suositellaan, että puolistaattisissa testeissä, joissa testiaineen pitoisuuden odotetaan pysyvän ± 20 prosentissa (ts. välillä 80-120 %) nimellispitoisuudesta (ks. kohta 1.4 ja 1.8.4), suurimmat ja pienimmät testissä käytetyt pitoisuudet määritetään tuoreista testiliuoksista ja viljelynestettä vaihdettaessa kerran ensimmäisen testiviikon aikana (ts. määritys olisi tehtävä samasta liuoksesta, kun se on tuore ja kun se vaihdetaan). Nämä määritykset olisi tehtävä tämän jälkeen uudelleen vähintään viikon välein.

▼B

Testeissä, joissa testiaineen pitoisuuden ei odoteta pysyvän ± 20 prosentissa nimellisarvosta, on välttämätöntä määrittää testipitoisuudet sekä tuoreesta liuoksesta että liuosta vaihdettaessa. Kuitenkin jos mitattu testiaineen alkupitoisuus ei ole ± 20 prosentissa nimellisarvosta, mutta jos on riittävästi näyttöä siitä, että alkupitoisuudet ovat toistettavia ja stabiileja (ts. välillä 80-120 % alkupitoisuudesta), viikolla 2 ja 3 voitaisiin määrittää vain suurin ja pienin testipitoisuus. Joka tapauksessa testiaineen pitoisuus tarvitsee määrittää liuosta vaihdettaessa vain yhdestä rinnakkaisnäytteestä kullekin pitoisuudelle.

Jos kyseessä on läpivirtaustesti, samanlainen näytteenotto-ohjelma on sopiva kuin puolistaattisissa testeissä (vaikka ”vanhasta” liuoksesta ei tehdä määritystä). Voi kuitenkin olla suositeltavaa lisätä näytteenottoajankohtia ensimmäisen viikon aikana (esim. kolme määrityssarjaa) sen varmistamiseksi, että testipitoisuudet ovat pysyneet muuttumattomina. Tällaisissa testeissä laimentimen ja testiaineen virtausnopeus on tarkistettava päivittäin.

Jos on näyttöä siitä, että testattavan aineen pitoisuus on pysynyt tyydyttävällä tavalla ± 20 prosentissa nimellispitoisuudesta tai alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulokset voivat perustua nimellispitoisuuksiin tai alkupitoisuuksiin. Jos poikkeama nimellispitoisuudesta tai alkupitoisuudesta on suurempi kuin ± 20 %, tulokset olisi ilmaistava aikapainotettuina keskiarvoina (ks. lisäys 5).

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tämän testin tarkoituksena on määrittää testiaineen vaikutus elävien jälkeläisten kokonaismäärään testin lopussa elossa olevien emojen määrää kohti. Elävien jälkeläisten kokonaismäärä emojen määrää kohti olisi laskettava jokaiselle testiastialle (ts. rinnakkaisnäytteille). Jos jossakin rinnakkaisnäytteessä emo kuolee testin aikana tai osoittautuu koiraaksi, kyseinen rinnakkaisnäyte jätetään testin ulkopuolelle. Analyysi perustuu silloin pienempään määrään rinnakkaisnäytteitä.

Kun selvitettäessä kemikaalin vaikutuksia lisääntymistuotokseen määritetään LOEC ja siitä NOEC, on laskettava kaikkien rinnakkaisnäytteiden keskimääräinen lisääntymistuotos kullekin pitoisuudelle ja painotettu jäännösvakiopoikkeama. Tämä voidaan tehdä varianssianalyysillä (ANOVA). Kunkin pitoisuuden keskiarvoa on tämän jälkeen verrattava kontrollien keskiarvoon käyttämällä sopivaa vertailumenetelmää. Dunnettin tai Williamsin testit voivat olla hyödyllisiä (14) (15) (16) (17). On myös tarkistettava, pitääkö ANOVAn olettamus varianssin homogeenisuudesta paikkansa. Suositellaan, että tämä tehdään graafisesti mieluummin kuin formaalilla merkitsevyystestillä (18); sopiva vaihtoehto on Bartlettin testi. Jos oletus ei pidä paikkaansa, on harkittava tulostietojen muuntamista varianssien tasoittamiseksi ennen ANOVAa tai painotetun ANOVAn tekemistä. ANOVAlla määritetty havaittavan vaikutuksen suuruus (ts. pienin merkitsevä ero) olisi laskettava ja ilmoitettava.

▼B

Sellaisen pitoisuuden arvioimiseksi, joka aiheuttaisi 50 prosentin pienenemisen lisääntymistuotoksessa (ts. EC_{50}), tulostietoihin olisi sovitettava jokin sopiva käyrä, kuten logistinen käyrä, käyttämällä jotakin tilastomenetelmää, kuten pienimmän neliösumman menetelmää. Käyrään voitaisiin valita sellaiset muuttujat, että EC_{50} ja sen keskivirhe voidaan määrittää käyrästä suoraan. Tämä helpottaisi suuresti EC_{50}:n luottamusrajojen laskemista. Ellei ole erityisiä syitä käyttää erilaisia luottamusrajoja, kaksipuolinen 95 prosentin raja olisi ilmoitettava. Sovitusmenetelmän pitäisi mielellään olla sellainen, että voidaan arvioida sovituksen onnistumisen (tai sen puutteen) merkitsevyys. Tämä voidaan tehdä graafisesti tai jakamalla jäännösneliösumma sovituksen onnistumista ja puhdasta virhettä koskeviin komponentteihin ja tekemällä merkitsevyystesti sovituksen onnistumiselle. Koska korkeaan hedelmällisyyteen johtavilla käsittelyillä on todennäköisesti suurempi tuotettujen nuorten yksilöiden määrän varianssi kuin alhaiseen hedelmällisyyteen johtavilla käsittelyillä, olisi harkittava havaittujen arvojen painottamista siten, että ne heijastaisivat eri käsittelyryhmien erilaisia variansseja (ks. taustatietoa viitteessä 18).

Lopullisen rengastestin (2) tulostietoja analysoitaessa niihin sovitettiin logistinen käyrä käyttämällä seuraavaa mallia, vaikka muitakin sopivia malleja voi käyttää:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

jossa:

Y = nuorten eläinten kokonaismäärä testin lopussa elossa olevaa aikuista eläintä kohti (laskettu kullekin testiastialle)

x: = testiaineen pitoisuus

c = nuorten eläinten oletettu määrä, kun x = 0

x_0 = populaation EC_{50}-arvo

b = kulmakertoimen laskemisessa käytetty muuttuja.

Tämä malli sopii todennäköisesti moniin tapauksiin, mutta kaikkiin testeihin se ei ehkä sovi. Mallin validiteetti olisi tarkistettava, kuten edellä on mainittu. Joissakin tapauksissa sopiva malli voi olla sellainen, jossa pienet pitoisuudet aiheuttavat huomattavia vaikutuksia (19).

Muita vaikutuksiin liittyviä pitoisuuksia, kuten EC_{10} tai EC_{20}, voidaan myös arvioida, vaikka voi olla parempi käyttää mallissa erilaisia muuttujia kuin EC_{50}:n arvioimiseksi käytettyjä.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

2.2.1 **Testiaine**

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä,

▼B

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan lukien puhtaus.

2.2.2 **Koelajit**

— kyseessä oleva klooni (onko genotyyppi määritetty), hankintapaikka tai alkuperä (jos se tunnetaan) sekä käytetyt viljelyolosuhteet. Jos käytetään muuta lajia kuin *Daphnia magna,* se on perusteltava ja ilmoitettava.

2.2.3 **Koeolosuhteet:**

— käytetty testimenetelmä (esim. puolistaattinen tai läpivirtausmenetelmä, vesikirppujen lukumäärä litrassa kokeen alussa,

— valoisa aika ja valon intensiteetti,

— testin suunnittelu (esim. rinnakkaisnäytteiden määrä, emojen määrä rinnakkaisnäytettä kohti),

— käytetty viljelyneste yksityiskohtaisesti,

— mahdollisesti käytetyn orgaanisen aineen koostumus, alkuperä, valmistusmenetelmä, varastovalmisteiden TOC/COD, testissä käytetyn viljelynesteen TOC/COD:n arviointi,

— yksityiskohtaiset ruokintaa koskevat tiedot, mukaan lukien määrä (mg C/vesikirppu/vrk) ja esim. rehu(je)n tyyppi, myös mahdollisten levien spesifiset nimet (lajit) ja kanta, jos ne tunnetaan, sekä viljelyolosuhteet,

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja viljelynesteen vaihtotaajuus (mahdollisen liuottimen tai dispergointiaineen nimi ja pitoisuus on ilmoitettava).

2.2.4 **Tulokset:**

— mahdollisista alustavista testiaineen stabiilisuutta koskevista kokeista saadut tulokset,

— nimelliset testipitoisuudet ja kaikkien analyysien tulokset, joissa on määritetty testiaineen pitoisuus testiastiassa (ks. esimerkiksi annetut tuloslomakkeet, lisäys 4); myös menetelmän saantoteho ja määritysraja olisi ilmoitettava,

— testiastioissa käytetyn veden laatu (ts. pH, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus sekä tarvittaessa TOC ja/tai COD ja veden kovuus) (ks. esimerkiksi annettu tuloslomake, lisäys 3),

— täydelliset kirjaustiedot kunkin emon elävistä jälkeläisistä (ks. esimerkiksi annettu tuloslomake, liite 3),

— emojen kuolemantapausten lukumäärä ja päivämäärät (ks. esimerkiksi annettu tuloslomake, lisäys 3,

— kontrollihedelmällisyyden vaihtelukerroin (joka perustuu elävien jälkeläisten kokonaismäärään testin lopussa elossa olevaa emoa kohti),

— kuvaaja, josta käy ilmi elävien jälkeläisten kokonaismäärä testin lopussa elossa olevaa emoa kohti (kullekin rinnakkaisnäytteelle) testiaineen pitoisuuden funktiona,

— LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) lisääntymiselle; käytettyjen tilastomenetelmien kuvaus; maininta siitä, minkä kokoinen vaikutus voitiin osoittaa; NOEC (No Observed Effect Concentration) lisääntymiselle tarvittaessa; tapauksen mukaan myös LOEC/NOEC emojen kuolleisuudelle olisi ilmoitettava,

▼B

— tarvittaessa EC_X lisääntymiselle, luottamusvälit, sen laskemiseen käytetyn sovitetun mallin graafinen kuvaaja, annos-vastekäyrän kulmakerroin ja sen keskivirhe,

— muut havaitut biologiset vaikutukset tai muut mittaukset: ilmoitetaan kaikki mahdolliset havaitut tai mitatut biologiset vaikutukset (esim. emojen kasvu) sekä kaikki asianmukaiset perustelut,

— selitykset testimenetelmästä poikkeamiseen.

3. **LÄHDELUETTELO**

(1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.

(2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

(3) Baird D. J., Barber J., Bradley M. C., Soares A. M. V. M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, pp. 257-265.

(4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, pp. 25-33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, pp. 775-782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

(8) Baird D. J., Soares A. M. V. M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), pp. 144-148.

(9) Parkhurst B. R., Forte J. L. and Wright G. P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, pp. 1-8.

(10) Cowgill U. M. and Milazzo D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), pp. 185-196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims I. R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, pp. 2053-2058.

▼B

(13) Sims 1. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol.. 128, pp. 459-466.

(14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(16) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, pp. 510-531.

(18) Draper N. R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, pp. 93-96.

(20) Wilson E. O. and Bossert, W. H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(21) Poole R. W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, pp.-532.

(22) Meyer J. S., Ingersoll C. G., McDonald L. L. and Boyce M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap tcchniques. Ecology, 67, pp. 1156-1166.

▼B

Lisäys 1

KEMIALLISESTI MÄÄRITELTYJEN ELENDT M7- JA M4-VILJELYNESTEIDEN VALMISTUS

Totuttaminen Elendt M7- ja M4-viljelynesteeseen

Joissakin laboratorioissa on ollut vaikeuksia, kun ne ovat siirtäneet vesikirput suoraan M4- (1) tai M7-viljelynesteeseen. Siirto onnistuu paremmin totuttamalla vesikirput asteittain uuteen viljelynesteeseen: ensin siirretään entisestä viljelynesteestä 30-prosenttiseen, sitten 60-prosenttiseen ja lopulta 100-prosenttiseen Elendt-viljelynesteeseen. Totuttamisvaiheen pitää mahdollisesti olla jopa kuukauden pituinen.

VALMISTELU

Hivenaineet

Ensin valmistetaan erilliset varastoliuokset (1) yksittäisistä hivenaineista sopivalla tavalla, esim. deionisoimalla, tislaamalla tai käänteisosmoosilla puhdistettuun veteen. Näistä eri varastoliuoksista (1) valmistetaan yksi ainoa varastoliuos (11), jossa on kaikkia hivenaineita (yhdistetty liuos), ts:

Varastoliuokset I (yksi aine)	Veteen lisätty määrä (mg/l)	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) (-kertainen)	Valmistettaessa yhdistettyä varastoliuosta II lisätään veteen seuraavat määrät varastoliuoksia I (ml/l)	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2 * 4 H_2O$	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2 * 6 H_2o$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
$Na_2MoO_4 * 2 H_2O$	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2 * 2 H_2O$	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2 * 6 H_2O$	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
$Na_2EDTA * 2 H_2O$	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4 * 7 H_2O$	1 991	2 000	—	—
Sekä Na_2EDTA- että $FeSO_4$-liuokset valmistetaan erikseen, yhdistetään ja autoklavoidaan välittömästi. Tuloksena on:				
21 Fe-EDTA-liuos		1 000	20,0	5,0

▼B

M4- ja M7-viljelyneste

M4- ja M7-viljelynesteet valmistetaan käyttäen varastoliuosta II, makroravinteita ja vitamiineja seuraavasti:

	Veteen lisätty määrä (mg/l)	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) (-kertainen)	Viljelynesteen valmistamiseen tarvittava varastoliuoksen määrä (ml/l)	
			M 4	M 7
Varastoliuos II yhdistetyt hivenaineet		20	50	50
Makroravinteiden varastoliuos (yksittäisiä aineita)				
$CaCl_2$ * 2 H_2O	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4$ * 7 H_2O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
Na_2SiO_3 * 9 H_2O	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Yhdistetty vitamiinien varastoliuos	—	10 000	0,1	0,1
Yhdistetty vitamiinien varastoliuos valmistetaan lisäämällä kaikkia kolmea vitamiinia 1 litraan vettä seuraavasti:				
Tiamiinihydrokloridi	750	10 000	—	—
Syaanikobalamiini (B_{12})	10	10 000	—	—
Biotiini	7,5	10 000	—	—

Yhdistetty vitamiinien varastoliuos säilytetään jäädytettynä pienissä erissä. Vitamiinit lisätään viljelynesteeseen vähän ennen käyttöä.

Huom. Jotta suolat eivät saostuisi lopullista viljelynesteliuosta valmistettaessa, varastoliuokset lisätään 500-800 ml:aan deionisoitua vettä ja täytetään sitten 3 litraksi.

Huom. M4-viljelynesteen kokoonpanoa koskeva ensimmäinen julkaisuviite on Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, s. 25-33.

▼B

Lisäys 2

ORGAANISIIN YHDISTEISIIN SITOUTUNEEN HIILEN KOKONAISMÄÄRÄN (TOC) MÄÄRITYS JA NOMOGRAMMIN LAATIMINEN LEVÄREHUN TOC-PITOISUUDELLE

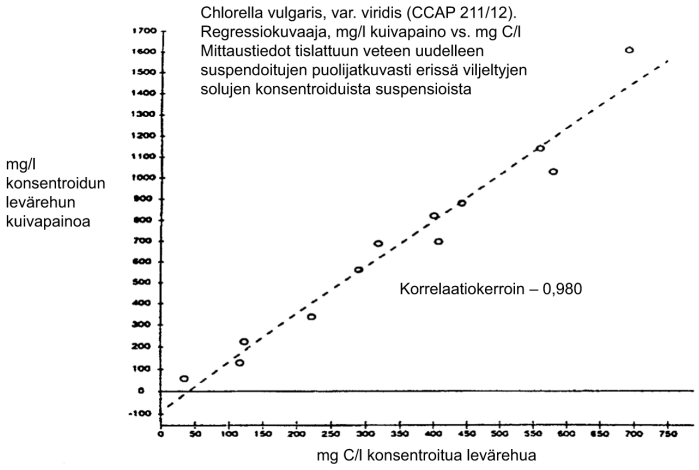
Levärehun hiilipitoisuutta ei tunnetusti mitata suoraan, vaan se määritetään korvaavilla menetelmillä kuten levysolujen määrän tai valon absorption perusteella laadittujen nomogrammien avulla.

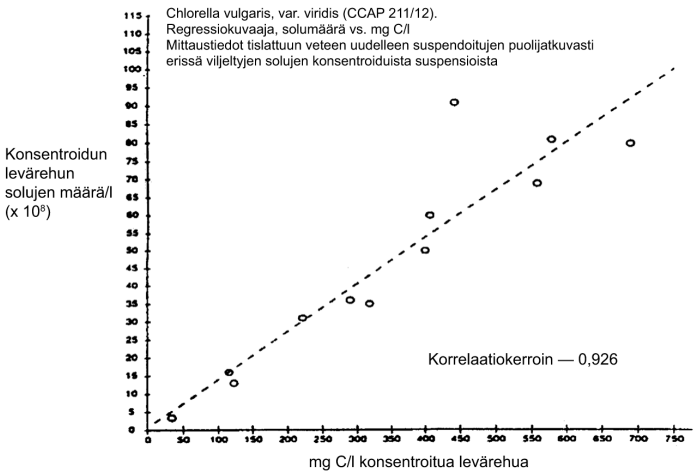
TOC olisi mitattava mieluummin korkeassa lämpötilassa tapahtuvan oksidaation avulla kuin UV- tai persulfaattimenetelmällä. (ks. The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinants 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Nomogrammin laatimista varten levät olisi erotettava viljelynesteestä sentrifugoimalla, jonka jälkeen ne suspendoidaan uudelleen tislattuun veteen. Korvaava muuttuja ja TOC-pitoisuus määritetään kustakin näytteestä (kolme rinnakkaista). Tislattuun veteen perustuvat nollanäytteet määritetään ja niiden TOC-pitoisuus vähennetään levänäytteen TOC-pitoisuudesta.

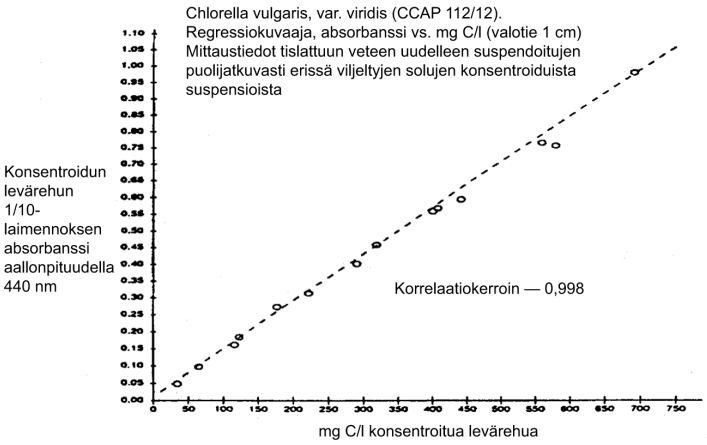
Nomogrammin olisi oltava lineaarinen tarvittavalla hiilipitoisuusalueella. Jäljempänä annetaan esimerkkejä.

Huom. Näitä nomogrammeja ei saisi käyttää muuntamiseen. Jokaisen laboratorion on laadittava omat nomogrammit.





▼B


Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 112/12).
Regressiokuvaaja, absorbanssi vs. mg C/l (valotie 1 cm)
Mittaustiedot tislattuun veteen uudelleen suspendoitujen puolijatkuvasti erissä viljeltyjen solujen konsentroiduista suspensioista
Konsentroidun levärehun 1/10-laimennoksen absorbanssi aallonpituudella 440 nm
Korrelaatiokerroin — 0,998
mg C/l konsentroitua levärehua

▼B

LISÄYS 3

ESIMERKKI LOMAKKEESTA, JOHON KIRJATAAN VILJELYNESTEEN VAIHDOT, FYSIKAALISET JA/TAI KEMIALLISET SEURANTATIEDOT, RUOKKIMINEN. VESIKIRPUN LISÄÄNTYMINEN JA TÄYSIKASVUISTEN KUOLLEISUUS

Koe nro:		Aloituspvm:			Klooni:				Viljelyneste				Ravintotyyppi:				Testiaine:					Nimellispitoisuus:		
Päivä	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Viljelynesteen vaihto (rasti)																								
pH (1)																							tuore	
																							vanha	
O_2 mg/l (1)																							tuore	
																							vanha	
Lämpötila (°C) (1)																							tuore	
																							vanha	
Ruokkiminen (rasti)																								
Elävien jälkeläisten määrä (2)																								Yhteensä
Astia 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

2008R0440 — FI — 22.03.2014 — 004.001 — 1124

▼B

Koe nro:		Aloituspvm:			Klooni:			Viljelyneste			Ravintotyyppi:				Testiaine:					Nimellispitoisuus:				
Päivä	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Yhteensä	
Kumulatiivinen aikuisten kuolleisuus ([3])																								

([1]) Ilmoitettava, mitä astiaa käytettiin kokeeseen.
([2]) Kuolleet aikuiset kirjataan merkinnällä ”M” asianomaiseen ruutuun.
([3]) Abortoituneet jälkeläiset kirjataan merkinnällä ”AB” asianomaiseen ruutuun.

▼B

Lisäys 4

ESIMERKKI LOMAKKEESTA, JOHON KIRJATAAN KEMIALLISTEN MÄÄRITYSTEN TULOKSET

(a) **Mitatut pitoisuudet**

Nimellispitoisuus	Viikon 1 näyte		Viikon 2 näyte		Viikon 3 näyte	
	tuore	vanha	tuore	vanha	tuore	vanha

(b) **Mitatut pitoisuudet prosentteina nimellisarvoista**

Nimellispitoisuus	Viikon 1 näyte		Viikon 2 näyte		Viikon 3 näyte	
	tuore	vanha	tuore	vanha	tuore	vanha

▼B

Lisäys 5

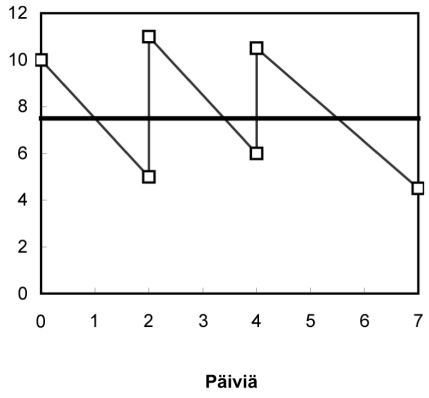
AIKAPAINOTETUN KESKIARVON LASKEMINEN

Aikapainotettu keskiarvo

Koska testiaineen pitoisuus voi laskea viljelynesteen vaihtojen välillä, on harkittava, mikä pitoisuus olisi valittava edustamaan sitä pitoisuusaluetta, jossa emovesikirppu on elänyt. Valinnan pitäisi perustua sekä biologisiin että tilastollisiin näkökohtiin. Jos esimerkiksi oletetaan, että lisääntymiseen vaikuttaa lähinnä huippupitoisuus, olisi käytettävä suurinta pitoisuutta. Jos taas oletetaan, että myrkyllisen aineen kerääntynyt tai pitkän aikavälin vaikutus on tärkeämpi, keskipitoisuus sopii paremmin. Silloin käytettäväksi sopiva asianmukainen keskiarvo on aikapainotettu keskipitoisuus, koska siinä otetaan huomioon hetkellisten pitoisuuksien vaihtelu ajan funktiona.

Kuva 1

Esimerkki aikapainotetusta keskiarvosta



Kuvassa 1 on (yksinkertaistettu) esimerkki testistä, joka kestää seitsemän päivää ja jossa viljelyneste vaihdetaan päivinä 0, 2 ja 4.

— Ohut sahaviiva kuvaa pitoisuutta eri ajankohtina. Pitoisuuden laskun oletetaan noudattavan eksponentiaalista hajoamisprosessia.

— Kuusi kuvaajaan merkittyä pistettä edustavat havaittuja pitoisuuksia, jotka on mitattu kunkin vaihtoperiodin alussa ja lopussa.

— Paksu yhtenäinen viiva esittää aikapainotetun keskiarvon sijaintia.

Aikapainotettu keskiarvo lasketaan siten, että aikapainotetun keskiarvon kuvaajan alle jäävä pinta-ala on yhtä suuri kuin pitoisuuskäyrän alle jäävä pinta-ala. Edellä olevaa esimerkkiä varten tehty laskutoimitus kuvataan taulukossa 1.

▼B

Taulukko 1

Aikapainotetun keskiarvon laskeminen

Vaihto nro	Päiviä	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Pinta-ala
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Päivien kokonaismäärä: 7					Kokonaispinta-ala	50,091
					Aikapainotettu keskiarvo	7,156

”Päiviä” on vaihtojen välissä olevien päivien määrä

”Conc 0” on kunkin vaihtoperiodin alussa mitattu pitoisuus

”Conc 1” on kunkin vaihtoperiodin lopussa mitattu pitoisuus

”Ln(Conc 0)” on Conc 0:n luonnonlogaritmi

”Ln(Conc 1)” on Conc 1:n luonnonlogaritmi

”Pinta-ala” on kutakin vaihtoperiodia vastaavan eksponentiaalisen käyrän alle jäävä pinta-ala

$$Pinta - ala = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times Päiviä$$

Aikapainotettu keskiarvo on kokonaispinta-ala jaettuna päivien kokonaismäärällä.

Vesikirpun lisääntymistestiä varten taulukon on tietysti katettava 21 päivää.

On selvää, että kun havaintoja tehdään vain kunkin vaihtoperiodin alussa ja lopussa, ei voida olla varmoja siitä, että hajoaminen on todella eksponentiaalista. Erilaisesta käyrästä olisi seurauksena erilainen pinta-ala. Eksponentiaalinen hajoamisprosessi ei kuitenkaan ole epätodennäköinen, ja sitä kuvaava käyrä on todennäköisesti paras, jota voidaan käyttää, kun muuta tietoa ei ole.

On kuitenkin esitettävä varoitus siltä varalta, että kemiallisessa määrityksessä ei havaita kyseistä ainetta lainkaan vaihtoperiodin lopussa. Ellei voida arvioida, kuinka nopeasti aine on hävinnyt liuoksesta, on mahdotonta saada todenmukaista pinta-alaa käyrän alle ja myös mahdotonta määrittää järkevää aikapainotettua keskiarvoa.

▼B

C.21. **MAAPERÄN MIKROBIT: TYPEN MUUNTUMISTESTI**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 216 (2000).

1.1 JOHDANTO

Tämän menetelmän tarkoitus on tutkia laboratoriomenetelmin kemikaalien pitkäaikaisvaikutuksia maaperän mikrobien typpeä muuntavaan toimintaan (typen transformaatioon) kerta-altistuksen jälkeen. Menetelmä perustuu pääosin EPPO:n (Euroopan ja Välimeren maiden kasvinsuojelujärjestön) (1) suosituksiin. Myös muita, esimerkiksi Saksan Biologische Bundesanstaltin (2), Yhdysvaltain ympäristönsuojeluviraston (3), SETACin (4) ja Kansainvälisen standardisoimisjärjestön (5) laatimia ohjeita on otettu huomioon. Menetelmässä käytettävien maanäytteiden määrästä ja tyypistä on sovittu maalajin ja sedimentin valintaa käsitelleessä OECD:n työryhmässä, joka kokoontui Belgiratessa Italiassa vuonna 1995 (6). Maanäytteiden keräämiseen, käsittelyyn ja varastointiin liittyvät suositukset perustuvat ISO:n ohjeisiin (7) sekä Belgiraten työryhmän suosituksiin. Testiaineiden toksisten ominaisuuksien arvioinnin yhteydessä voi olla tarpeen määrittää niiden vaikutukset maaperän mikrobien toimintaan, esimerkiksi kun tarvitaan tietoja kasvinsuojeluaineiden mahdollisista sivuvaikutuksista maaperän pieneliöstöön tai kun on odotettavissa maaperän mikrobien altistuminen muille kemikaaleille kuin kasvinsuojeluaineille. Typen muuntumistestin avulla voidaan määrittää kyseisten kemikaalien vaikutukset maaperän pieneliöstöön. Jos testattavat aineet ovat maatalouskemikaaleja (esimerkiksi kasvinsuojeluaineita, lannoitteita tai metsätalouskemikaaleja), on tehtävä sekä typen että hiilen muuntumistestit. Jos testattavat aineet ovat muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, pelkkä typen muuntumistesti riittää. Mikäli kyseisten kemikaalien typen muuntumistestistä saadut EC_{50}-arvot ovat kaupallisissa nitrifikaatiota estävissä aineissa (esimerkiksi nitrapyriini) esiintyvällä alueella, hiilen muuntumistesti voidaan tehdä lisätietojen saamiseksi.

Maaperä muodostuu elävästä ja elottomasta aineesta, joka esiintyy erilaisina, heterogeenisina seoksina. Mikrobeilla on tärkeä osuus viljavien maannosten orgaanisen aineen hajottamisessa ja muuttamisessa, ja monet eliölajit vaikuttavat maannoksen viljavuuden eri tekijöihin. Kaikki pitkäaikaiset vaikutukset näihin biokemiallisiin prosesseihin saattavat muuttaa ravinnekiertoa, jolloin maannoksen viljavuus saattaa muuttua. Hiilen ja typen muuntuminen tapahtuu kaikissa viljavissa maannoksissa. Vaikka nämä prosessit aiheuttava mikrobiyhteisö on erilainen eri maalajeissa, muuntumisreitit ovat olennaisilta osin samat.

Tässä kuvatun menetelmän tarkoitus on osoittaa testiaineen pitkäaikaiset haittavaikutukset typen muuntumisprosessiin aerobisissa pintamaissa. Menetelmän avulla voidaan myös arvioida aineiden vaikutusta maaperän pieneliöstön aiheuttamaan hiilen muuntumiseen. Nitraatin muodostuminen tapahtuu hiili-typpisidosten hajoamisen jälkeen. Jos siis nitraatin tuotannon havaitaan olevan samalla tasolla käsitellyissä maanäytteissä ja kontrollinäytteissä, on hyvin todennäköistä, että pääasialliset hiilisidosten hajoamisreitit toimivat hyvin. Menetelmässä käytettävän kasvualustan (jauhettu sinimailasseos) hiili-typpisuhde on edullinen (yleensä 12/1-16/1). Tästä syystä hiilen puute ei ole merkittävää testin aikana, ja jos kemikaali vahingoittaa mikrobiyhteisöjä, ne saattavat toipua 100 päivän kuluessa.

▼B

Tämän menetelmän perustana olevat testit ovat olleet tarkoitettuja pääasiassa aineille, joiden maaperään päätyvä määrä on ennakoitavissa. Tällaisia aineita ovat esimerkiksi kasvinsuojeluaineet, sillä niiden annostelu pellolle tiedetään. Maataloudessa käytettävien kemikaalien kohdalla riittää, kun testataan kaksi annostasoa oletetun annostelutiheyden mukaan. Maataloudessa käytettävien kemikaalien osalta voidaan testata tehoaine tai kaupallinen valmiste. Tässä esitetyn menetelmän soveltamisala ei kuitenkaan rajoitu maataloudessa käytettäviin kemikaaleihin. Muuttamalla sekä maaperään annosteltavan testiaineen määrää että tulosten arviointia menetelmällä voidaan testata myös sellaisia kemikaaleja, joiden maaperään päätyvästä määrästä ei ole tietoa. Muista kuin maataloudessa käytettävistä kemikaaleista määritetään useiden konsentraatioiden vaikutukset typen muuntumiseen. Testitulosten perusteella laaditaan annos-vastekäyrä ja lasketaan EC_x-arvot, joissa x on määritelty vaikutus prosentteina.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Typen muuntuminen: mikrobien toiminnan tuloksena ammonifikaatio- ja nitrifikaatioprosessin kautta tapahtuva, typpeä sisältävän orgaanisen aineen lopullinen hajoaminen vastaavaksi epäorgaaniseksi lopputuotteeksi, nitraatiksi.

EC_X (efektiivinen konsentraatio): maaperässä esiintyvä testiaineen konsentraatio, joka estää typen muuntumista nitraatiksi x prosentilla.

EC_{50} **(efektiivinen mediaanikonsentraatio):** maaperässä esiintyvä testiaineen konsentraatio, joka estää typen muuntumista nitraatiksi 50 prosentilla.

1.3 VERTAILUAINE

Ei käytössä.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Seulottua maa-ainesta parannetaan jauhetulla kasviseoksella, ja se joko käsitellään testiaineella tai jätetään käsittelemättä (kontrollinäyte). Maataloudessa käytettäviä kemikaaleja testattaessa suositellaan käytettäväksi vähintään kahta testikonsentraatiota, ja ne tulee valita suhteessa suurimpaan konsentraatioon, jonka odotetaan esiintyvän kentällä. Näytteitä inkuboidaan, päivinä 0, 7, 14 ja 28 käsitellyt näytteet ja kontrollinäytteet uutetaan sopivaan liuottimeen, ja uutteista määritetään nitraattimäärät. Nitraatinmuodostuksen nopeutta käsitellyissä näytteissä verrataan vastaavaan nopeuteen kontrollinäytteissä ja käsiteltyjen näytteiden ja kontrollinäytteiden välinen prosentuaalinen ero lasketaan. Kaikkia testejä jatketaan vähintään 28 päivän ajan. Jos päivänä 28 käsiteltyjen näytteiden ja kontrollinäytteiden välinen ero on 25 % tai enemmän, mittauksia jatketaan (enintään 100 päivään asti). Jos testattavana on muu kuin maataloudessa käytettävä kemikaali, maanäytteisiin lisätään sarja testiaineen konsentraatioita ja muodostuneen nitraatin määrä mitataan käsitellyistä näytteistä ja kontrollinäytteistä 28 päivän inkubaation jälkeen. Useita konsentraatioita käyttäneiden testien tulokset analysoidaan regressiomallia käyttäen ja EC_x-arvot lasketaan (EC_{50}, EC_{25} ja/tai EC_{10}). Katso kohta Määritelmät.

1.5 TESTIN VALIDITEETTI

Maataloudessa käytettävien kemikaalien testitulosten arviot perustuvat suhteellisen pieniin eroihin (esimerkiksi keskiarvo ± 25 %) käsiteltyjen näytteiden ja kontrollinäytteiden nitraattikonsentraatioiden välillä, joten kontrollinäytteiden suuri vaihtelu voi johtaa virheellisiin tuloksiin. Tästä syystä rinnakkaisten kontrollinäytteiden välisen vaihtelun tulisi olla alle ± 15 %.

▼B

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Laitteet**

Testissä käytetään säiliöitä, jotka on valmistettu kemiallisesti inertistä materiaalista. Säiliöiden koon tulee sopia maanäytteiden inkubaatiomenettelyyn (joko massana tai sarjana erillisiä maanäytteitä, katso kohta 1.7.1.2). On syytä varmistaa, että veden haihtuminen testin aikana on minimaalista ja kaasujen vaihtuminen on mahdollista (testisäiliö voidaan esimerkiksi peittää rei'itetyllä polyetyleenikalvolla). Testattaessa helposti haihtuvia aineita tulee käyttää kannellisia ja kaasutiiviitä säiliöitä. Niiden koon tulisi olla sellainen, että maanäyte täyttää noin neljäsosan niiden tilavuudesta.

Testissä käytetään seuraavia tavanomaisia laboratoriovälineitä:

— sekoituslaite: mekaaninen ravistin tai vastaava laite,

— sentrifugi (3 000 g) tai suodatin (käytetään nitraattia sisältämätöntä suodatinpaperia),

— nitraattianalyysia varten riittävän herkkä mittalaite, jonka mittaustulos on toistettavissa.

1.6.2 **Testattavien maalajien valinta ja määrä**

Testissä käytetään yhtä maalajia. Näytteeksi valittavan maannoksen suositeltavat ominaisuudet ovat seuraavat:

— hiekkapitoisuus: vähintään 50 % ja enintään 75 %,

— pH: 5,5 - 7,5,

— orgaanisen hiilen pitoisuus: 0,5 - 1,5 %

— mikrobibiomassa mitataan (8)(9), ja sen hiilipitoisuuden tulee olla vähintään 1 % maaperän orgaanisen hiilen kokonaispitoisuudesta.

Useimmissa tapauksissa tällainen maannos edustaa pahinta mahdollista tapausta, koska testiaineen adsorboituminen on minimaalista ja sen saatavuus pieneliöstölle maksimaalista. Tämän takia ei yleensä ole tarpeen testata muita maalajeja. Kuitenkin joissain olosuhteissa, esimerkiksi kun testiainetta ennakoidaan käytettäväksi ennen kaikkea happamien metsämaiden tapaisissa maannoksissa tai kun kemikaali on elektrostaattisesti varautunut, voi olla tarpeen käyttää testissä myös toista maalajia.

▼B

1.6.3 **Maanäytteiden kerääminen ja varastointi**

1.6.3.1 *Kerääminen*

Käytettävissä tulisi olla yksityiskohtaiset tiedot näytteenkeräyspaikan historiasta. Näitä tietoja ovat tarkka paikka, kasvipeite, kasvinsuojeluainekäsittelyjen päivämäärät, käsittelyt orgaanisilla ja epäorgaanisilla lannoitteilla, biologisten materiaalien lisäykset tai satunnaiset saastumiskerrat. Näytteenkeräyspaikaksi valitun paikan tulisi olla pitkäaikainen. Sopivia paikkoja ovat jatkuvasti laidunmaana käytettävät alueet, vuosittain korjattavien viljakasvien (paitsi maissin) pellot tai tiheään kylvetyt viherkesannot. Näytteenottopaikaksi soveltuu alue, jota ei ole käsitelty kasvinsuojeluaineilla vähintään vuoteen ennen näytteenottoa. Soveltuvalla alueella ei myöskään ole käytetty orgaanista lannoitetta vähintään kuuteen kuukauteen. Mineraalilannoitteiden käyttö on hyväksyttävää vain silloin, kun se on viljeltävän kasvin vaatimusten mukaista, ja maanäytteet voidaan tällöin ottaa vasta vähintään kolmen kuukauden kuluttua lannoitteen käytöstä. Näytteiden ottamista maasta, jota on käsitelty biosidin tavoin vaikuttavalla lannoitteella (esimerkiksi kalsiumsyanamidilla), tulisi välttää.

Näytteenottoa tulisi välttää pitkien (yli 30 päivää) kuivien tai vedellä kyllästymisjaksojen aikana tai välittömästi niiden jälkeen. Auratuilla mailla näytteet on otettava 0-20 cm:n syvyydestä. Nurmimailla (laitumilla) tai muilla maa-alueilla, joita ei aurata pitkään aikaan (vähintään yhteen kasvukauteen), näytteenoton enimmäissyvyys voi olla hiukan yli 20 cm (esimerkiksi 25 cm).

Maanäytteet tulee kuljettaa säiliöissä ja sellaisessa lämpötilassa, jossa maanäytteen alkuperäiset ominaisuudet eivät muutu merkittävästi.

1.6.3.2 *Varastointi*

Käytetyn maa-aineksen on mahdollisuuksien mukaan oltava äskettäin maasta otettua. Jos varastointi on välttämätöntä, maanäytteet voidaan varastoida pimeässä 4 (±2) C:n lämpötilassa enintään kolmen kuukauden ajan. Näytteiden varastoinnin aikana on varmistettava, että olosuhteet ovat aerobiset. Jos näytteet on kerätty alueilta, joilla maaperä on jäässä vähintään kolme kuukautta vuodesta, varastointi kuuden kuukauden ajan - 18 — - 22 °C:n lämpötilassa voi tulla kysymykseen. Varastoitavien näytteiden mikrobibiomassa mitataan ennen kutakin koetta. Biomassan hiilipitoisuuden tulee olla vähintään 1 % näytteen orgaanisen hiilen kokonaispitoisuudesta (katso kohta 1.6.2).

1.6.4 **Näytteiden käsittely ja valmistelu testiä varten**

1.6.4.1 *Esi-inkubaatio*

Jos näytettä on varastoitu (katso kohta 1.6.3.2), suositellaan sen esi-inkuboimista 2-28 päivän ajan. Esi-inkubaation aikana näytteen lämpötilan ja kosteuspitoisuuden tulisi olla samanlaiset kuin testissä käytetyt (katso kohdat 1.6.4.2 ja 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2 *Fysiko-kemialliset ominaisuudet*

Näytteestä puhdistetaan manuaalisesti suuret hiukkaset (esimerkiksi kivet ja kasvinosat), minkä jälkeen se märkäseulotaan liikaa kuivaamatta 2 mm:n tai tätä pienempään raekokoon. Näytteen kosteuspitoisuus tulee säätää tislatulla tai ionipuhdistetulla vedellä 40-60 %:iin maksimaalisesta vedenpidätyskyvystä.

1.6.4.3 *Parannus orgaanisella substraatilla*

Maanäytettä tulee parantaa sopivalla orgaanisella substraatilla, esimerkiksi jauhetulla sinimailas-ruohoseoksella (pääaineksena *Medicago sativa),* jonka hiili-typpisuhde on 12/1-16/1. Suositeltu sinimailasen ja maa-aineksen suhde on 5 g sinimailasta yhteen kiloon maa-ainesta (kuivapaino).

1.6.5 **Testiaineen valmistelu näytteeseen annostelua varten**

Testiaine annostellaan tavallisesti kantaja-aineen avulla. Kantaja-aineena voi olla vesi (vesiliukoisten testiaineiden tapauksessa) tai inertti kiintoaine, kuten hieno kvartsihiekka (raekoko 0,1 - 0,5 mm). Muita nestemäisiä kantaja-aineita kuin vettä (esimerkiksi orgaanisia liuottimia, kuten asetonia ja kloroformia) tulee välttää, koska ne saattavat vahingoittaa pieneliöstöä. Jos kantaja-aineena käytetään hiekkaa, se voidaan pinnoittaa testiaineella, joka on liuotettu tai suspendoitu sopivaan liuottimeen. Tällaisissa tapauksissa liuotin tulee poistaa haihduttamalla ennen kuin kantaja-aine sekoitetaan maa-ainekseen. Jotta testiaine leviäisi näytteessä optimaalisesti, suositellaan suhteeksi 10 g hiekkaa yhtä näytteen kuivapainokiloa kohti. Kontrollinäytteet käsitellään vastaavalla määrällä pelkkää vettä ja/tai kvartsihiekkaa.

Testattaessa helposti haihtuvia kemikaaleja tulisi mahdollisuuksien mukaan välttää aineen hävikkiä käsittelyn aikana ja pyrkiä varmistamaan aineen tasainen leviäminen näytteeseen (esimerkiksi ruiskuttamalla testiaine näytteeseen useisiin kohtiin).

1.6.6 **Testikonsentraatiot**

Jos testataan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, tulee käyttää ainakin kahta konsentraatiota. Pienemmän konsentraation tulee kuvastaa vähintään testiaineen käytännössä maaperään pääsevää maksimimäärää, ja suuremman konsentraation puolestaan tulee olla pienemmän kerrannainen. Maanäytteeseen lisättävät testiaineen konsentraatiot lasketaan olettaen, että aine imeytyy tasaisesti 5 cm:n syvyyteen ja että maamassan tiheyden arvo on 1,5. Testattaessa maataloudessa käytettäviä, suoraan maaperään annosteltavia kemikaaleja tai kemikaaleja, joiden maaperään pääsevä määrä on ennakoitavissa, suositeltavat testikonsentraatiot ovat suurin odotettavissa oleva konsentraatio ympäristössä (Predicted Environmental Concentration, PEC) sekä mainittu konsentraatio kerrottuna viidellä. Testattaessa aineita, joita ennakoidaan annosteltaviksi maaperään useita kertoja kasvukaudessa, testikonsentraatio tulee johtaa kertomalla odotettavissa oleva ympäristössä havaittava enimmäiskonsentraatio ennakoitujen annostelukertojen määrällä. Suurin testikonsentraatio ei kuitenkaan saa olla suurempi kuin kymmenen kertaa suurin yksittäinen annos. Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, tulee testissä käyttää vähintään viiden konsentraation geometrista sarjaa. Valittujen testikonsentraatioiden tulee kattaa EC_x-arvojen määrittämiseksi tarvittava alue.

▼B

1.7 TESTIN SUORITUS

1.7.1 **Altistusolosuhteet**

1.7.1.1 *Testinäytteet ja kontrollinäytteet*

Jos testataan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, maanäyte jaetaan kolmeen samanpainoiseen osaan. Kahteen osaan sekoitetaan testiaineen sisältävää kantaja-ainetta ja kolmanteen sekoitetaan kantaja-ainetta, joka ei sisällä testiainetta (kontrollinäyte). On suositeltavaa käyttää vähintään kolmea rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä. Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, maanäyte jaetaan kuuteen samanpainoiseen osaan. Viiteen osaan sekoitetaan testiaineen sisältävää kantaja-ainetta ja kuudenteen sekoitetaan kantaja-ainetta, joka ei sisällä testiainetta. On suositeltavaa käyttää kolmea rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä. Testiaineen tasainen leviäminen testinäytteisiin tulee varmistaa. Sekoittamisen aikana on vältettävä näytteen tiivistämistä tai muotoutumista palloksi.

1.7.1.2 *Maanäytteiden inkubointi*

Maanäytteiden inkubointi voidaan toteuttaa kahdella tavalla: massana testi- ja kontrollinäytteestä tai sarjana yksittäisiä, samankokoisia osanäytteitä testi- ja kontrollinäytteestä. Helposti haihtuvien aineiden testi on kuitenkin toteutettava sarjalle yksittäisiä osanäytteitä. Kun maanäytteet inkuboidaan massana, kutakin testi- ja kontrollinäytettä valmistetaan suuri määrä, josta analysoitavat osanäytteet otetaan tarpeen mukaan testin aikana. Alun perin valmistettava testi- ja kontrollinäytteen määrä riippuu osanäytteiden koosta, analysoitavien rinnakkaisnäytteiden määrästä sekä arvioitujen näytteenottokertojen enimmäismäärästä. Massana inkuboidut maanäytteet tulee sekoittaa huolellisesti ennen osanäytteen ottoa. Kun maanäytteet inkuboidaan yksittäisten näytteiden sarjana, kukin testi- ja kontrollimassanäyte jaetaan tarvittaviin osanäytteisiin, joita sitten käytetään tarpeen mukaan. Kokeissa, joissa näytteenottokertoja ennakoidaan olevan enemmän kuin kaksi, osanäytteitä tulee valmistaa riittävästi kaikkia rinnakkaisnäytteitä ja näytteenottokertoja varten. Vähintään kolme testattavan maanäytteen rinnakkaisnäytettä tulee inkuboida aerobisissa olosuhteissa (katso kohta 1.7.1.1). Kaikkien testien aikana tulee käyttää asianmukaisia säiliöitä, joissa on riittävästi ilmatilaa, jotta vältetään anaerobisten olosuhteiden kehittyminen. Kun testataan haihtuvia aineita, testi tulee aina tehdä sarjalle yksittäisiä osanäytteitä.

1.7.1.3 *Testiolosuhteet ja testin kesto*

Testi toteutetaan pimeässä 20 (±2) °C:n huoneenlämmössä. Maanäytteiden kosteuspitoisuus tulee pitää testin aikana 40-60 %:ssa näytteen maksimaalisesta vedenpidätyskyvystä (katso kohta 1.6.4.2) vaihteluvälillä ± 5 %. Tarvittaessa voidaan lisätä tislattua, ionipuhdistettua vettä.

Testien vähimmäiskesto on 28 päivää. Testattaessa maataloudessa käytettäviä kemikaaleja verrataan testi- ja kontrollinäytteiden nitraatinmuodostusnopeutta. Jos näiden ero on yli 25 % päivänä 28, testiä jatketaan, kunnes saavutetaan 25 %:n tai tätä pienempi ero, tai sadan päivän ajan sen mukaan, kumpaan menee vähemmän aikaa. Testattaessa muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja testi lopetetaan 28 päivän kuluttua. Päivänä 28 määritetään nitraattimäärät testi- ja kontrollinäytteissä sekä lasketaan EC_x-arvot.

▼B

1.7.2 **Näytteenotto ja näytteiden analyysi**

1.7.2.1 *Näytteenottoaikataulu*

Jos testataan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, maanäytteistä analysoidaan nitraatti päivinä 0, 7, 14 ja 28. Jos testiä on jatkettava, jatkomittaukset tehdään 14 päivän välein päivästä 28 lähtien.

Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, tulee käyttää vähintään viittä testikonsentraatiota ja näytteistä analysoidaan nitraatti testin alussa (päivä 0) ja altistusjakson lopussa (28 päivää). Tarvittaessa voidaan tehdä välimittaus esimerkiksi päivänä 7. Päivänä 28 saatavien tietojen mukaan määritetään kemikaalin EC_x-arvo. Haluttaessa voidaan raportoida maanäytteen alkuperäinen nitraattimäärä päivän 0 tietojen perusteella.

1.7.2.2 *Maanäytteiden analyysi*

Muodostuneen nitraatin määrä määritetään kaikista testi- ja kontrollinäytteiden rinnakkaisnäytteistä kullakin näytteenottokerralla. Nitraatti erotetaan maanäytteestä ravistamalla näytettä sopivassa liuottimessa, esimerkiksi kaliumkloridiliuoksessa (0,1 M). Suositeltava suhde on 5 ml kaliumkloridiliuosta maanäytteen yhtä kuivapainogrammaa kohti. Erotuksen optimoimiseksi maanäytteen ja liuottimen sisältävien säiliöiden tulee olla täytetty vain puolilleen. Sekoituksia ravistellaan 150 rpm 60 minuutin ajan. Sekoitukset sentrifugoidaan tai suodatetaan ja nestefaasista analysoidaan nitraatti. Nestemäiset uutteet, joissa ei ole hiukkasia, voidaan säilyttää ennen analyysia - 20 ± 5 °C:n lämpötilassa enintään kuuden kuukauden ajan.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Jos tutkitaan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, kaikissa rinnakkaisnäytteissä muodostuneen nitraatin määrä raportoidaan ja kaikkien rinnakkaisnäytteiden keskiarvoista laaditaan taulukko. Typen muuntumisnopeudet tulee arvioida asianmukaisilla ja yleisesti hyväksytyillä tilastollisilla menetelmillä (esimerkiksi F-testi, 5 %:n merkitsevyystaso). Muodostuneen nitraatin määrät ilmoitetaan milligrammoina per maanäytteen kuivapainokilo per päivä. Kunkin käsittelyn yhteydessä ilmenevää nitraatinmuodostusnopeutta verrataan kontrollinäytteeseen ja prosentuaalinen ero kontrollinäytteeseen verrattuna lasketaan.

Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, kussakin rinnakkaisnäytteessä muodostuneen nitraatin määrä määritetään ja laaditaan annos-vastekäyrä EC_x-arvojen arvioimista varten. Testinäytteissä 28 päivän jälkeen havaittuja nitraattimääriä (mg / maanäytteen kuivapainokilo) verrataan kontrollinäytteissä havaittuihin nitraattimääriin. Näistä tiedoista lasketaan prosentuaaliset estoarvot kaikille testikonsentraatioille. Laaditaan kuvaaja, jossa nämä prosenttiarvot esitetään konsentraation funktiona, ja EC_x-arvot lasketaan tilastollisin menetelmin. Luottamusvälit ($p = 0,95$) lasketuille EC_x-arvoille määritetään myös standardimenetelmillä (10)(11)(12).

Suuria typpimääriä sisältävät testiaineet saattavat vaikuttaa testin aikana syntyvän nitraatin määrään. Jos näitä aineita testataan suurilla konsentraatioilla (esimerkiksi kemikaalit, joita ennakoidaan annosteltavan toistuvasti), testiin tulee sisällyttää asianmukaiset kontrollit (esimerkiksi maanäyte ja testiaine ilman kasviseosta). Näistä kontrolleista saadut tiedot tulee ottaa huomioon EC_x-arvojen laskennassa.

▼B

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Kun maataloudessa käytettävien kemikaalien testituloksia arvioitaessa nitraatinmuodostusnopeuden ero alimman testiaineannostuksen (joka vastaa ennakoitua enimmäiskonsentraatiota) ja kontrollinäytteen välillä on 25 % tai vähemmän millä tahansa näytteenottokerralla päivän 28 jälkeen, voidaan arvioida, että testiaineella ei ole pitkäaikaista vaikutusta typen muuntumiseen maaperässä. Arvioitaessa muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja tuloksissa esitetään EC_{50}-, EC_{25}- ja/tai EC_{10}-arvot.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot.

Tunnistetiedot testinäytteestä, mukaan lukien:

— näytteenottopaikan maantieteellinen sijainti (leveys- ja pituusaste),

— näytteenottopaikan historia (esimerkiksi kasvipeite, käsittelyt kasvinsuojeluaineilla, lannoitekäsittelyt, satunnainen saastuminen),

— käyttötapa (esimerkiksi maanviljelysmaa, metsä),

— näytteenottosyvyys (cm),

— hiekka-/siltti-/savipitoisuus (% kuivapainosta),

— pH (vedessä),

— orgaanisen hiilen pitoisuus (% kuivapainosta),

— typpipitoisuus (% kuivapainosta),

— alkuperäinen nitraattikonsentraatio (mg nitraattia / kg kuivapainoa),

— kationinvaihtokyky (mmol/kg),

— mikrobibiomassa prosentteina orgaanisen hiilen kokonaismäärästä,

— viitetiedot kunkin parametrin määritysmenetelmästä,

— tiedot maanäytteiden keräämisestä ja varastoinnista,

— maaperän esi-inkubointitiedot tarvittaessa.

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysiko-kemialliset ominaisuudet,

— tarvittaessa kemialliset tunnistetiedot, mukaan lukien rakennekaava, puhtaus (esimerkiksi kasvinsuojeluaineista tehoaineen prosenttiosuus), typpipitoisuus.

Kasvualusta:

— kasvualustan lähde,

— koostumus (esimerkiksi sinimailanen, sinimailas-ruohoseos),

— hiili- ja typpipitoisuus (% kuivapainosta),

— seulan reiän koko (mm).

▼B

Testiolosuhteet:

— tiedot maanäytteen parantamisesta orgaanisella kasvualustalla,

— testiaineen konsentraatioiden määrä ja tarvittaessa niiden valinta-perusteet,

— tiedot testiaineen annostelusta maahan,

— inkubaatiolämpötila,

— näytteen kosteuspitoisuus testin alussa ja sen aikana,

— näytteen inkubointitapa (massana tai useina erillisinä osanäytteinä),

— rinnakkaisnäytteiden määrä,

— näytteenottoajankohdat,

— menetelmä nitraatin uuttamiseksi näytteestä.

Tulokset:

— nitraatin analysoinnissa käytetty menetelmä ja laitteisto,

— taulukko nitraattimittausten yksittäisistä arvoista ja keskiarvoista,

— testi -ja kontrollinäytteiden rinnakkaisnäytteiden välinen vaihtelu,

— laskuihin tehtyjen korjausten selitykset tarvittaessa,

— nitraatinmuodostusnopeuden prosentuaalinen vaihtelu kullakin näytteenottokerralla tai soveltuvin osin EC_{50}-arvo 95 %:n luottamusvälein, muu EC_x-arvo (joko EC_{25} tai EC_{10}) luottamusvälein ja annos-vastekäyrä,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— kaikki tulosten tulkinnan kannalta hyödylliset tiedot ja havainnot.

4. **LÄHDELUETTELO**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (toinen painos 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28. syyskuuta 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bryssel.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality — Biological Methods.*

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italia, 18. -20. tammikuuta 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. Kolmas painos, Cambridge, Lontoo ja New York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, Iso-Britannia.

▼B

C.22. MAAPERÄN MIKROBIT: HIILEN MUUNTUMISTESTI

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 217 (2000).

1.1 JOHDANTO

Tämän menetelmän tarkoitus on tutkia laboratoriomenetelmin kasvinsuojeluaineiden ja mahdollisesti muiden kemikaalien pitkäaikaisia vaikutuksia maaperän mikrobien hiiltä muuntavaan toimintaan kertaaltistuksen jälkeen. Testi perustuu pääosin Euroopan ja Välimeren alueen kasvinsuojelujärjestön (OEPP) antamiin suosituksiin (1). Myös muiden elinten, esimerkiksi Saksan Biologische Bundesanstaltin (2), Yhdysvaltain ympäristönsuojeluviraston (3), ja SETACin (4) laatimat ohjeet on otettu huomioon. Menetelmässä käytettävien maanäytteiden määrästä ja tyypistä on sovittu maalajin ja sedimentin valintaa käsitelleessä OECD:n työryhmässä, joka kokoontui Belgiratessa Italiassa vuonna 1995 (5). Maanäytteiden keräämiseen, käsittelyyn ja varastointiin liittyvät suositukset perustuvat ISO:n ohjeisiin (6) sekä Belgiraten työryhmän suosituksiin.

Testiaineiden toksisten ominaisuuksien arvioinnin yhteydessä voi olla tarpeen määrittää niiden vaikutukset maaperän mikrobien toimintaan, esimerkiksi silloin kun tarvitaan tietoja kasvinsuojeluaineiden mahdollisista sivuvaikutuksista maaperän pieneliöstöön tai kun on odotettavissa maaperän mikrobien altistuminen muille kemikaaleille kuin kasvinsuojeluaineille. Hiilen muuntumistestin tarkoituksena on määrittää kyseisten kemikaalien vaikutukset maaperän pieneliöstöön. Jos testattavat aineet ovat maatalouskemikaaleja (esimerkiksi kasvinsuojeluaineita, lannoitteita tai metsätalouskemikaaleja), on tehtävä sekä hiilen että typen muuntumistestit. Jos testattavat aineet ovat muita kuin maatalouskemikaaleja, pelkkä typen muuntumistesti riittää. Mikäli kyseisten kemikaalien typen muuntumistestistä saadut EC_{50}-arvot ovat kaupallisissa nitrifikaatiota estävien aineiden (esimerkiksi nitrapyriini) alueella, hiilen muuntumistesti voidaan tehdä lisätietojen saamiseksi.

Maaperä muodostuu elävästä ja elottomasta aineesta, joka esiintyy erilaisina, heterogeenisina seoksina. Mikrobeilla on tärkeä osuus viljavien maannosten orgaanisen aineen hajottamisessa ja muuntamisessa, ja monet eliölajit vaikuttavat maannoksen viljavuuden eri tekijöihin. Kaikki pitkäaikaiset vaikutukset näihin biokemiallisiin prosesseihin saattavat muuttaa ravinnekiertoa, jolloin maannoksen viljavuus saattaa muuttua. Hiilen ja typen muuntumista tapahtuu kaikissa viljavissa maannoksissa. Vaikka nämä prosessit aiheuttava mikrobiyhteisö on erilainen eri maalajeissa, muuntumisreitit ovat olennaisilta osin samat.

▼B

Tässä kuvatun menetelmän tarkoitus on todeta testiaineen pitkäaikaiset haittavaikutukset hiilen muuntumisprosessiin aerobisissa pintamaissa. Testin avulla voidaan havaita hiiltä muuntavien mikrobiyhteisöjen koon ja toiminnan muutoksia, koska testi altistaa mikrobiyhteisöt sekä kemialliselle stressille että hiilenpuutteelle. Testissä käytetään hiekkaista maannosta, joka sisältää niukasti orgaanista ainetta. Maannos käsitellään testiaineella ja inkuboidaan olosuhteissa, joissa mikrobien aineenvaihdunta on nopeaa. Tällaisissa olosuhteissa maannoksen sisältämä helposti saatava hiili loppuu nopeasti. Tämä aiheuttaa hiilenpuutteen, joka sekä tappaa mikrobisoluja että aiheuttaa horroksen ja/tai lepoitiöiden muodostumisen. Jos testiä jatketaan yli 28 päivän ajan, näiden reaktioiden summa voidaan mitata (käsittelemätöntä maa-ainesta sisältävistä) kontrollinäytteistä metabolisesti aktiivisen mikrobibiomassan asteittain etenevänä vähenemisenä (7). Jos hiilikadosta kärsivän maa-aineksen biomassaan kohdistuu testiolosuhteissa jonkin kemikaalin vaikutus, testinäytteen biomassa ei mahdollisesti palaudu samalle tasolle kuin kontrollinäytteen. Niinpä testiaineen milloin tahansa testin aikana aiheuttamat häiriöt kestävät usein testin loppuun asti.

Tämän menetelmän perustana olevat testit ovat olleet tarkoitetut pääasiassa aineille, joiden maaperään päätyvä määrä on ennakoitavissa. Tällaisia aineita ovat esimerkiksi kasvinsuojeluaineet, sillä niiden levitystiheys pellolle tiedetään. Maataloudessa käytettävien kemikaalien osalta riittää kahden sellaisen annoksen testaaminen, jotka kuvastavat oletettua levitysannosta. Maatalouskemikaalit voidaan testata tehoaineena tai (kaupallisena) valmisteena. Tässä esitetyn menetelmän soveltamisala ei kuitenkaan rajoitu kemikaaleihin, joiden ympäristössä havaittavat konsentraatiot ovat ennustettavissa. Muuttamalla sekä maannokseen levitettävän testiaineen määrää että tulosten arviointitapaa menetelmällä voidaan testata myös sellaisia kemikaaleja, joiden maaperään päätyvää määrää ei tunneta. Muista kuin maataloudessa käytettävistä kemikaaleista määritetään useiden konsentraatioiden vaikutukset hiilen muuntumiseen. Testitulosten perusteella laaditaan annos-vastekäyrä ja lasketaan EC_x-arvot, joissa x on määritelty vaikutus prosentteina.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Hiilen muuntuminen: mikrobien toiminnan tuloksena tapahtuva orgaanisen aineen hajoaminen epäorgaaniseksi lopputuotteeksi, hiilidioksidiksi.

EC_X (efektiivinen konsentraatio): maaperässä esiintyvä testiaineen konsentraatio, joka estää hiilen muuntumista hiilidioksidiksi x prosentilla.

EC_{50} **(efektiivinen mediaanikonsentraatio):** maaperässä esiintyvä testiaineen konsentraatio, joka estää hiilen muuntumista hiilidioksidiksi 50 prosentilla.

1.3 VERTAILUAINE

Ei käytössä.

▼B

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Seulottua maa-ainesta joko käsitellään testiaineella tai käsittely jätetään tekemättä (kontrollinäyte). Maataloudessa käytettäviä kemikaaleja testattaessa suositellaan käytettäväksi vähintään kahta testikonsentraatiota, ja ne tulee valita suhteessa suurimpaan konsentraatioon, jonka odotetaan esiintyvän testattavassa ympäristössä. Inkubaatioajan (0, 7, 14 ja 28 päivää) jälkeen käsiteltyihin näytteisiin ja kontrollinäytteisiin sekoitetaan glukoosia, ja glukoosin aiheuttaman soluhengityksen nopeutta mitataan yhtäjaksoisesti 12 tunnin ajan. Soluhengitysnopeus ilmoitetaan vapautuneena hiilidioksidina (milligrammaa hiilidioksidia/kuivapainokilo/tunti) tai kulutettuna happena (milligrammaa happea / maanäytteen kilo / tunti). Soluhengitysnopeuden keskiarvoa käsitellyissä näytteissä verrataan vastaavaan nopeuteen kontrollinäytteissä ja käsiteltyjen näytteiden ja kontrollinäytteiden välinen prosentuaalinen ero lasketaan. Kaikkia testejä jatketaan vähintään 28 päivän ajan. Jos päivänä 28 käsiteltyjen näytteiden ja kontrollinäytteiden välinen ero on 25 % tai enemmän, mittauksia jatketaan 14 päivän välein enintään 100 päivään asti. Jos testattavana on muu kuin maataloudessa käytettävä kemikaali, maanäytteisiin lisätään sarja testiaineen konsentraatioita, ja muodostuneen glukoosin aiheuttama soluhengitysnopeus (muodostuneen hiilidioksidin tai kulutetun hapen määrän keskiarvo) mitataan käsitellyistä näytteistä ja kontrollinäytteistä 28 päivän inkubaation jälkeen. Useita konsentraatioita käyttäneiden testien tulokset analysoidaan regressiomallia käyttäen ja EC_x-arvot lasketaan (EC_{50}, EC_{25} ja/tai EC_{10}). Katso kohta Määritelmät.

1.5 TESTIN VALIDITEETTI

Maatalouskemikaalien testitulosten arviot perustuvat suhteellisen pieniin eroihin (esimerkiksi keskiarvo ±25 %) käsitellyissä näytteissä ja kontrollinäytteissä vapautuneen hiilidioksidin tai näytteiden kuluttaman hapen välillä, joten kontrollinäytteiden suuri vaihtelu voi johtaa virheellisiin tuloksiin. Tästä syystä rinnakkaisten kontrollinäytteiden välisen vaihtelun pitäisi olla alle ±15 %.

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Laitteet**

Testissä käytetään säiliöitä, jotka on valmistettu kemiallisesti inertistä materiaalista. Säiliöiden on sovittava kooltaan maanäytteiden inkubaatiomenettelyyn (joko koko massana tai sarjana erillisiä maanäytteitä, katso kohta 1.7.1.2). Testin aikana on syytä varmistaa, että veden haihtuminen on mahdollisimman vähäistä ja että kaasujen vaihtuminen on mahdollista (testisäiliö voidaan esimerkiksi peittää rei'itetyllä polyetyleenikalvolla). Testattaessa helposti haihtuvia aineita tulee käyttää kannellisia ja kaasutiiviitä säiliöitä. Niiden koon tulisi olla sellainen, että maanäyte täyttää noin neljäsosan niiden tilavuudesta.

Glukoosin aiheuttaman soluhengityksen mittaamiseksi tarvitaan inkubointijärjestelmä ja mittauslaitteet, joilla voidaan mitata hiilidioksidin tuotantoa tai hapen kulutusta. Tällaisia järjestelmiä ja mittauslaitteita kuvataan jäljempänä mainituissa kirjallisuusviitteissä (8) (9) (10) (11).

1.6.2 **Testattavien maalajien valinta ja määrä**

Testissä käytetään yhtä maalajia. Näytteeksi valittavan maannoksen suositeltavat ominaisuudet ovat seuraavat:

— hiekkapitoisuus: vähintään 50 % ja enintään 75 %,

▼B

— pH: 5,5 - 7,5,

— orgaanisen hiilen pitoisuus: 0,5 - 1,5 %,

— mikrobibiomassa mitataan (12)(13), ja sen hiilipitoisuuden tulee olla vähintään 1 % maaperän orgaanisen hiilen kokonaispitoisuudesta.

Useimmissa tapauksissa tällainen maannos on hankalin mahdollinen tapaus, koska testiaineen adsorboituminen on minimaalista ja sen saatavuus pieneliöstölle maksimaalista. Tämän vuoksi ei yleensä ole tarpeen testata muita maalajeja. Kuitenkin joissain olosuhteissa, esimerkiksi kun testiainetta ennakoidaan käytettäväksi runsaasti ennen kaikkea happamien metsämaiden tapaisissa maannoksissa tai kun kemikaali on elektrostaattisesti varautunut, voi olla tarpeen käyttää testissä toista maalajia.

1.6.3 **Maanäytteiden kerääminen ja varastointi**

1.6.3.1 *Kerääminen*

Näytteenkeräyspaikasta tulisi olla käytettävissä yksityiskohtaiset taustatiedot. Näitä tietoja ovat tarkka sijainti, kasvipeite, kasvinsuojeluainekäsittelyjen päivämäärät, käsittelyt orgaanisilla ja epäorgaanisilla lannoitteilla, biologisten materiaalien lisäykset tai satunnaiset saastumiskerrat. Näytteenkeräyspaikaksi valitun paikan tulisi olla pitkäaikainen. Sopivia paikkoja ovat jatkuvasti laidunmaana käytettävät alueet, vuosittain korjattavien viljakasvien (paitsi maissin) pellot tai tiheään kylvetyt viherkesannot. Näytteenottopaikaksi soveltuu alue, jota ei ole käsitelty kasvinsuojeluaineilla vähintään vuoteen ennen näytteenottoa. Soveltuvalla alueella ei myöskään ole käytetty orgaanista lannoitetta vähintään kuuteen kuukauteen. Mineraalilannoitteiden käyttö on hyväksyttävää vain silloin, kun se on viljeltävän kasvin kannalta tarpeen; maanäytteet voidaan tällöin ottaa vasta vähintään kolmen kuukauden kuluttua lannoitteen käytöstä. Näytteiden ottamista maasta, jota on käsitelty biosidin tavoin vaikuttavalla lannoitteella (esimerkiksi kalsiumsyanamidilla), tulisi välttää.

Näytteenottoa tulisi välttää pitkien (yli 30 päivän) kuivuuden tai vettymisjaksojen aikana tai välittömästi niiden jälkeen. Auratuilla mailla näytteet on otettava 0-20 cm:n syvyydestä. Nurmimailla (laitumilla) tai muilla maa-alueilla, joita ei aurata pitkään aikaan (vähintään yhteen kasvukauteen), näytteenoton enimmäissyvyys voi olla hiukan yli 20 cm (esimerkiksi enintään 25 cm). Maanäytteet on kuljetettava säiliöissä sellaisessa lämpötilassa, jossa maanäytteen alkuperäiset ominaisuudet eivät muutu merkittävästi.

1.6.3.2 *Varastointi*

Käytetyn maa-aineksen on oltava mieluiten äskettäin maasta otettua. Jos on välttämätöntä käyttää laboratoriossa varastoitua maa-ainesta, maanäytteet voidaan varastoida pimeässä 4 (±2) °C:n lämpötilassa enintään kolmen kuukauden ajan. Näytteiden varastoinnin aikana on varmistettava, että olosuhteet ovat aerobiset. Jos näytteet on kerätty alueilta, joilla maaperä on jäässä vähintään kolme kuukautta vuodesta, varastointi kuuden kuukauden ajan - 18 °C:n lämpötilassa voi tulla kysymykseen. Varastoitavien näytteiden mikrobibiomassa mitataan ennen kutakin koetta. Biomassan hiilipitoisuuden on oltava vähintään 1 % näytteen orgaanisen hiilen kokonaispitoisuudesta (katso kohta 1.6.2).

▼B

1.6.4 **Näytteiden käsittely ja valmistelu testiä varten**

1.6.4.1 *Esi-inkubaatio*

Jos näytettä on varastoitu (katso kohta 1.6.4.2 ja 1.7.1.3), suositellaan sen esi-inkuboimista 2-28 päivän ajan. Esi-inkubaation aikana näytteen lämpötilan ja kosteuspitoisuuden tulisi olla samanlaiset kuin testissä käytetyt (katso kohdat 1.6.4.2 ja 1.7.1.3)

1.6.4.2 *Fysiko-kemialliset ominaisuudet*

Näytteestä puhdistetaan manuaalisesti suuret vieraat esineet (esimerkiksi kivet ja kasvinosat), minkä jälkeen se märkäseulotaan liikaa kuivaamatta enintään 2 mm:n raekokoon. Näytteen kosteuspitoisuus tulee säätää tislatulla tai ionipuhdistetulla vedellä 40-60 %:iin maksimaalisesta vedenpidätyskyvystä.

1.6.5 **Testiaineen valmistelu näytteeseen annostelua varten**

Testiaine annostellaan tavallisesti kantaja-aineen avulla. Kantaja-aineena voi olla vesi (vesiliukoisten testiaineiden yhteydessä) tai inertti kiintoaine, kuten hieno kvartsihiekka (raekoko 0,1 - 0,5 mm). Muita nestemäisiä kantaja-aineita kuin vettä (esimerkiksi orgaanisia liuottimia, kuten asetonia ja kloroformia) tulee välttää, koska ne saattavat vahingoittaa pieneliöstöä. Jos kantaja-aineena käytetään hiekkaa, se voidaan pinnoittaa testiaineella, joka on liuotettu tai suspendoitu sopivaan liuottimeen. Tällaisissa tapauksissa liuotin tulee poistaa haihduttamalla ennen kuin kantaja-aine sekoitetaan maannokseen. Jotta testiaine leviäisi näytteessä optimaalisesti, suositellaan suhteeksi 10 g hiekkaa yhtä näytteen kuivapainokiloa kohti. Kontrollinäytteet käsitellään vastaavalla määrällä pelkkää vettä ja/tai kvartsihiekkaa.

Testattaessa helposti haihtuvia kemikaaleja tulisi mahdollisuuksien mukaan välttää aineen hävikkiä käsittelyn aikana ja pyrkiä varmistamaan aineen tasainen leviäminen näytteeseen (esimerkiksi ruiskuttamalla testiaine näytteeseen useisiin kohtiin).

1.6.6 **Testikonsentraatiot**

Jos testataan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja tai muita kemikaaleja, joiden pitoisuus ympäristössä on ennustettavissa, tulee käyttää ainakin kahta konsentraatiota. Pienemmän konsentraation tulee kuvastaa vähintään testiaineen käytännössä maaperään pääsevää enimmäismäärää, ja suuremman konsentraation puolestaan tulee olla pienemmän kerrannainen. Maanäytteeseen lisättävät testiaineen konsentraatiot lasketaan olettaen, että aine imeytyy tasaisesti 5 cm:n syvyyteen ja että maamassan tiheyden arvo on 1,5. Testattaessa maataloudessa käytettäviä, suoraan maaperään levitettäviä kemikaaleja tai kemikaaleja, joiden maaperään pääsevä määrä on ennakoitavissa, suositeltavat testikonsentraatiot ovat suurin odotettavissa oleva konsentraatio ympäristössä sekä mainittu konsentraatio kerrottuna viidellä. Testattaessa mahdollisesti useita kertoja kasvukaudessa maaperään levitettäviä aineita testikonsentraatio johdetaan kertomalla suurin odotettavissa oleva konsentraatio ympäristössä ennakoitujen levityskertojen määrällä. Suurin testikonsentraatio voi kuitenkin olla enintään kymmenen kertaa suurempi kuin suurin yksittäinen annos.

Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, tulee testissä käyttää vähintään viiden konsentraation geometrista sarjaa. Valittujen testikonsentraatioiden tulee kattaa EC_x-arvojen määrittämiseksi tarvittava alue.

▼B

1.7 TESTIN SUORITUS

1.7.1 **Altistusolosuhteet**

1.7.1.1 *Testinäytteet ja kontrollinäytteet*

Jos testataan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, maanäyte jaetaan kolmeen samanpainoiseen osaan. Kahteen osaan sekoitetaan testiaineen sisältävää kantaja-ainetta ja kolmanteen sekoitetaan kantaja-ainetta, joka ei sisällä testiainetta (kontrollinäyte). On suositeltavaa käyttää vähintään kolmea rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä. Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, maanäyte jaetaan kuuteen samanpainoiseen osaan. Viiteen osaan sekoitetaan testiaineen sisältävää kantaja-ainetta ja kuudenteen sekoitetaan kantaja-ainetta, joka ei sisällä testiainetta. On suositeltavaa käyttää kolmea rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä. Testiaineen tasainen leviäminen testinäytteisiin tulee varmistaa. Sekoittamisen aikana on vältettävä näytteen tiivistämistä tai muotoutumista palloksi.

1.7.1.2 *Maanäytteiden inkubointi*

Maanäytteiden inkubointi voidaan toteuttaa kahdella tavalla: massana testi- ja kontrollinäytteestä tai sarjana yksittäisiä, samankokoisia osanäytteitä testi- ja kontrollinäytteestä. Helposti haihtuvien aineiden testi on kuitenkin toteutettava sarjalle yksittäisiä osanäytteitä. Kun maanäytteet inkuboidaan massana, kutakin testi- ja kontrollinäytettä valmistetaan suuri määrä, josta analysoitavat osanäytteet otetaan tarpeen mukaan testin aikana. Alun perin valmistettava testi- ja kontrollinäytteen määrä riippuu osanäytteiden koosta, analysoitavien rinnakkaisnäytteiden määrästä sekä arvioitujen näytteenottokertojen enimmäismäärästä. Massana inkuboidut maanäytteet tulee sekoittaa huolellisesti ennen osanäytteen ottoa. Kun maanäytteet inkuboidaan yksittäisten näytteiden sarjana, kukin testi- ja kontrollimassanäyte jaetaan tarvittaviin osanäytteisiin, joita sitten käytetään tarpeen mukaan. Kokeissa, joissa näytteenottokertoja ennakoidaan olevan enemmän kuin kaksi, osanäytteitä tulee valmistaa riittävästi kaikkia rinnakkaisnäytteitä ja näytteenottokertoja varten. Vähintään kolme testattavan maanäytteen rinnakkaisnäytettä tulee inkuboida aerobisissa olosuhteissa (katso kohta 1.7.1.1). Kaikkien testien aikana tulee käyttää asianmukaisia säiliöitä, joissa on riittävästi ilmatilaa, jotta vältetään anaerobisten olosuhteiden kehittyminen. Kun testataan haihtuvia aineita, testi tulee aina tehdä sarjalle yksittäisiä osanäytteitä.

1.7.1.3 *Testiolosuhteet ja testin kesto*

Testi toteutetaan pimeässä 20 (±2) °C:n huoneenlämmössä. Maanäytteiden kosteuspitoisuus tulee pitää testin aikana 40-60 %:ssa näytteen maksimaalisesta vedenpidätyskyvystä (katso kohta 1.6.4.2) vaihteluvälillä ±5 %. Tarvittaessa voidaan lisätä tislattua, ionipuhdistettua vettä.

Testien vähimmäiskesto on 28 päivää. Testattaessa maataloudessa käytettäviä kemikaaleja verrataan testi- ja kontrollinäytteissä vapautuneen hiilidioksidin tai kulutetun hapen määrää. Jos näiden ero on yli 25 % päivänä 28, testiä jatketaan, kunnes saavutetaan enintään 25 % suuruinen ero, tai 100 päivän ajan sen mukaan, kumpaan kuluu vähemmän aikaa. Testattaessa muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja testi lopetetaan 28 päivän kuluttua. Päivänä 28 määritetään vapautuneen hiilidioksidin tai kulutetun hapen määrät testi- ja kontrollinäytteissä sekä lasketaan EC_x-arvot.

▼B

1.7.2 **Näytteenotto ja näytteiden analyysi**

1.7.2.1 *Näytteenottoaikataulu*

Jos testataan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, maanäytteistä analysoidaan glukoosin aiheuttama soluhengitysnopeus päivinä 0, 7, 14 ja 28. Jos testiä on jatkettava, jatkomittaukset tehdään 14 päivän välein päivästä 28 lähtien.

Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, tulee käyttää vähintään viittä testikonsentraatiota, ja näytteistä analysoidaan glukoosin aiheuttama soluhengitys testin alussa (päivä 0) ja altistusjakson lopussa (28 päivää). Tarvittaessa voidaan tehdä välimittaus esimerkiksi päivänä 7. Päivänä 28 saatuja tietoja käytetään kemikaalin EC_x-arvon määrittämiseksi. Haluttaessa voidaan arvioida maanäytteen alkuperäinen metabolisesti aktiivisen mikrobibiomassan määrä päivän 0 tietojen perusteella (12).

1.7.2.2 *Glukoosin aiheuttaman soluhengitysnopeuden mittaaminen*

Glukoosin aiheuttama soluhengitysnopeus mitataan kustakin testi- ja kontrollinäytteestä jokaisella näytteenottokerralla. Maanäytteisiin sekoitetaan sellainen glukoosimäärä, joka riittää aiheuttamaan välittömästi maksimaalisen soluhengitysvasteen. Kullekin maalajille riittävä määrä voidaan määrittää testaamalla esitestissä sarja glukoosipitoisuuksia (14). Hiekkamaannoksille, joiden orgaanisen hiilen pitoisuus on 0,5 - 1,5 %, riittävä annos on kuitenkin yleensä 2 000 - 4 000 mg glukoosia / maanäytteen kuivapainokilo. Glukoosi voidaan jauhaa hienoksi yhdessä puhtaan kvartsihiekan kanssa (10 g hiekkaa / maanäytteen kuivapainokilo) ja sekoittaa tasaisesti maanäytteeseen.

Glukoosilla parannettuja maanäytteitä inkuboidaan laitteessa, josta soluhengitysnopeus voidaan mitata joko jatkuvasti, joka tunti tai joka toinen tunti (katso kohta 1.6.1) 20 °C:n (±2) lämpötilassa. Vapautunut hiilidioksidi tai kulutettu happi mitataan yhtäjaksoisesti 12 tunnin aikana. Mittaukset tulee aloittaa mahdollisimman pian eli 1-2 tunnin kuluttua glukoosin lisäämisestä. Mitataan 12 tunnin aikana vapautuneen hiilidioksidin tai kulutetun hapen kokonaismäärä ja määritetään soluhengityksen keskinopeus.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Jos tutkitaan maatalouskemikaaleja, kunkin rinnakkaisnäytteessä vapautuneen hiilidioksidin tai kunkin maanäytteen kuluttaman hapen määrä raportoidaan, ja kaikkien rinnakkaisnäytteiden keskiarvoista laaditaan taulukko. Tulokset tulee arvioida asianmukaisilla ja yleisesti hyväksytyillä tilastollisilla menetelmillä (esimerkiksi F-testi, 5 %:n merkitsevyystaso). Glukoosin aiheuttama soluhengitysnopeus ilmoitetaan milligrammoina hiilidioksidia / maanäytteen kuivapainokilo / tunti tai milligrammoina happea / maanäytteen kuivapainokilo / tunti. Kustakin testinäytteestä saatua hiilidioksidin muodostumisnopeuden keskiarvoa tai hapen kulutusnopeuden keskiarvoa verrataan kontrollinäytteen arvoihin ja lasketaan prosentuaalinen poikkeama kontrollista.

▼B

Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, kussakin rinnakkaisnäytteessä vapautuneen hiilidioksidin tai kulutetun hapen määrä määritetään ja laaditaan annos-vastekäyrä EC_x-arvojen arvioimista varten. Testinäytteistä 28 päivän jälkeen havaittuja glukoosin aiheuttaman soluhengitysnopeuden arvoja (mg hiilidioksidia / maanäytteen kuivapainokilo / tunti tai mg happea / maanäytteen kuivapainokilo / tunti) verrataan kontrollinäytteistä havaittuihin arvoihin. Näistä tiedoista lasketaan prosentuaaliset estoarvot kaikille testikonsentraatioille. Laaditaan kuvaaja, jossa esitetään prosenttiosuudet konsentraation funktiona, ja EC_x-arvot lasketaan tilastollisin menetelmin. Luottamusväli ($p = 0,95$) lasketuille EC_x-arvoille määritetään myös standardimenetelmillä (15)(16)(17).

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Kun maatalouskemikaalien testituloksia arvioitaessa soluhengitysnopeuden ero alimman testiaineannostuksen (joka vastaa ennakoitua enimmäiskonsentraatiota) ja kontrollinäytteen välillä on 25 % tai vähemmän millä tahansa näytteenottokerralla päivän 28 jälkeen, voidaan arvioida, että testiaineella ei ole pitkäaikaista vaikutusta hiilen muuntumiseen maaperässä. Arvioitaessa muita kuin maatalouskemikaaleja tuloksissa esitetään EC_{50}-, EC_{25}-ja/tai EC_{10}-arvot.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testinäytteen täydelliset tunnistetiedot mukaan luettuina

— näytteenottopaikan maantieteellinen sijainti (leveys- ja pituusaste),

— näytteenottopaikkaa koskevat taustatiedot (esimerkiksi kasvipeite, käsittelyt kasvinsuojeluaineilla, lannoitekäsittelyt, satunnainen saastuminen),

— käyttötapa (esimerkiksi viljelysmaa, metsä),

— näytteenottosyvyys (cm),

— hiekka-/siltti-/savipitoisuus (% kuivapainosta)

— pH (vedessä),

— orgaanisen hiilen pitoisuus (% kuivapainosta),

— typpipitoisuus (% kuivapainosta),

— kationinvaihtokyky (mmol/kg),

— alkuperäinen mikrobibiomassa prosentteina orgaanisen hiilen kokonaismäärästä,

— viitetiedot kunkin parametrin määrittelymenetelmästä,

— tiedot maanäytteen keräämisestä ja varastoinnista,

— tiedot maanäytteen esi-inkubaatiosta.

▼B

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysiko-kemialliset ominaisuudet,

— tarvittaessa kemialliset tunnistetiedot, mukaan luettuna rakennekaava, puhtaus (esimerkiksi kasvinsuojeluaineista tehoaineen prosenttiosuus), typpipitoisuus.

Testiolosuhteet:

— tiedot maanäytteen parantamisesta orgaanisella kasvualustalla,

— testiaineen käytettyjen konsentraatioiden määrä ja tarvittaessa niiden valintaperusteet,

— tiedot testiaineen annostelusta näytteeseen,

— inkubaatiolämpötila,

— näytteen kosteuspitoisuus testin alussa ja sen aikana,

— näytteen inkubointitapa (massana tai useina erillisinä osanäytteinä),

— rinnakkaisnäytteiden määrä,

— näytteenottoajankohdat.

Tulokset:

— soluhengitysnopeuden mittauksessa käytetty menetelmä ja laitteisto,

— taulukko hiilidioksidi- tai happimittausten yksittäisistä arvoista ja keskiarvoista,

— testi- ja kontrollinäytteiden rinnakkaisnäytteiden välinen vaihtelu,

— laskuihin tehtyjen korjausten selitykset tarvittaessa,

— glukoosin aiheuttaman soluhengitysnopeuden prosentuaalinen vaihtelu kullakin näytteenottokerralla tai soveltuvin osin EC_{50}-arvo 95 %:n luottamusvälein, muu EC_x-arvo (joko EC_{25} tai EC_{10}) luottamusvälein ja annos-vastekäyrä,

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa,

— kaikki tulosten tulkinnan kannalta hyödylliset tiedot ja havainnot.

4. **LÄHDELUETTELO**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (toinen painos, 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28. syyskuuta 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bryssel.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italia, 18. -20. tammikuuta 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, teoksessa ”Pesticide Effects on Soil Microflora”. Toim. L. Somerville and M.P. Greaves, luku 3: 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, teoksessa ”Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties”. Agronomy Monograph № 9. Toim. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation- extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3. painos, toim., Cambridge, Lontoo ja New York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, Iso-Britannia.

▼B

(1) **C.23. KEMIKAALIEN AEROBINEN JA ANAEROBINEN HAJOAMINEN MAAPERÄSSÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 307 (2002)

1.1 JOHDANTO

Tämä menetelmä perustuu aikaisempiin ohjeisiin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ja 9. Kuvatun testimenetelmän tarkoitus on arvioida kemikaalien aerobista ja anaerobista hajoamista maaperässä. Testien avulla määritetään i) testiaineen hajoamisnopeus sekä ii) sellaisten hajoamistuotteiden laatu, joille kasvit ja maaperän mikrobit saattavat altistua, ja niiden muodostumis- ja häviämisnopeus. Nämä tutkimukset on tehtävä kemikaaleille, joita levitetään suoraan maaperään tai jotka todennäköisesti päätyvät maaperään. Laboratoriotutkimusten tulosten pohjalta voidaan myös kehittää vastaavissa kenttätutkimuksissa käytettäviä näytteenotto- ja analyysikäytäntöjä.

Hajoamisreittien arvioimiseksi riittää yleensä aerobinen ja anaerobinen testi yhdellä maannostyypillä (8)(10)(11). Hajoamisnopeuksien määrittämiseksi on käytettävä sen lisäksi vähintään kolmea maannostyyppiä (8)(10).

Belgiratessa Italiassa vuonna 1995 pidetyssä maannosten ja sedimenttien valintaa käsitelleessä OECD:n työryhmän kokouksessa sovittiin erityisesti tässä testissä käytettävien maannosten määrästä ja tyypeistä (10). Testattavien maannostyyppien pitää edustaa kattavasti ympäristöolosuhteita, joissa testiainetta käytetään tai joissa päästöt tapahtuvat. Esimerkiksi testattaessa kemikaaleja, joiden päästöjä saattaa tapahtua subtrooppisissa tai trooppisissa ilmastotyypeissä, täytyy käyttää FAO:n järjestelmän mukaisia Ferrasol (rauta-alu-maannos)- ja Nitosol (hohtosavimaannos) -tyyppejä. Työryhmä esitti myös maanäytteiden keräämiseen, käsittelyyn ja varastointiin liittyviä suosituksia, jotka perustuvat ISO:n ohjeisiin (15). Menetelmässä otetaan huomioon myös riisin kosteikkoviljelyyn käytettävät maannokset.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Testiaine: mikä tahansa aine, joko alkutuote tai merkitykselliset hajoamistuotteet.

Hajoamistuotteet: kaikki aineet, jotka syntyvät testiaineen bioottisista tai abioottisista hajoamisreaktioista, mukaan luettuina CO_2 ja tuotteet, jotka ovat sitoutuneissa jäämissä.

Sitoutuneet jäämät: maaperässä, kasveissa tai eläimissä esiintyvät yhdisteet, jotka uuttamisen jälkeen säilyvät matriisissa alkutuotteen tai sen metaboliitin (metaboliittien) / hajoamistuotteiden muodossa. Uuttomenetelmä ei saa olennaisesti muuttaa itse yhdisteitä tai matriisin rakennetta. Sidoksen luonnetta voidaan osittain selventää matriisia muuttavilla uuttomenetelmillä ja kehittyneillä analyysitekniikoilla. Tähän mennessä on tunnistettu tällä tavalla esimerkiksi kovalentit ioni- ja sorptiosidokset sekä sulkeuma-aineet. Yleisesti voidaan todeta, että sitoutuneiden jäämien muodostuminen vähentää aineen biologista saatavuutta ja hyötyosuutta merkittävästi (12) [vuodelta 1984 olevaan IUPAC-nimikkeistön tehty muutos (13)].

Aerobinen hajoaminen: reaktiot, joihin osallistuu molekyylistä happea (14).

▼B

Anaerobinen hajoaminen: reaktiot, joihin ei osallistu molekyylistä happea (14).

Maaperä: pienten organismien (pääasiassa mikro-organismien) eloperäiseksi tekemä sekoitus mineraalisia ja orgaanisia kemiallisia ainesosia, joista jälkimmäisiin sisältyy suuren hiili- ja typpipitoisuuden sisältäviä yhdisteitä sekä molekyylipainoltaan suuria yhdisteitä. Maaperää voidaan käsitellä kahdessa eri tilassa:

a) luonnontilaisena eli siinä muodossa, johon se on ajan kuluessa kehittynyt maannostyypilleen luonteenomaisiksi kerrostumiksi;

b) häiriintyneenä eli siinä muodossa, jossa se yleensä esiintyy viljellyissä peltomaissa tai tätä testimenetelmää varten kaivetuissa näytteissä (14).

Mineralisaatio: orgaanisen yhdisteen täydellinen hajoaminen CO_2:ksi ja H_2O:ksi aerobisissa olosuhteissa sekä CH_4:ksi, CO_2:ksi ja H_2O:ksi anaerobisissa olosuhteissa. Tässä testimenetelmässä käytettäessä merkkiaineena ^{14}C:ta mineralisaatio tarkoittaa laajaa hajoamista, jonka aikana merkitty hiiliatomi hapettuu ja vapautuu asianmukainen määrä $^{14}CO_2$:ta (14).

Puoliintumisaika: $t_{0,5}$ on aika, joka kuluu testiaineen 50-prosenttiseen hajoamiseen tapauksissa, joissa hajoaminen voidaan kuvata ensimmäisen asteen kinetiikan avulla. Puoliintumisaika ei riipu konsentraatiosta.

Häviämisaika 50 (DT_{50}): aika, jonka kuluessa testiaineen konsentraatio vähenee 50 %:lla; tämä arvo on eri kuin puoliintumisaika $t_{0,5}$ silloin kun hajoamista ei voi kuvata ensimmäisen asteen kinetiikan avulla.

Häviämisaika 75 (DT_{75}): aika, jonka kuluessa testiaineen konsentraatio vähenee 75 %:lla.

Häviämisaika 90 (DT_{90}): aika, jonka kuluessa testiaineen konsentraatio vähenee 90 %:lla.

1.3 VERTAILUAINEET

Hajoamistuotteiden karakterisointiin ja/tai tunnistukseen spektroskopia- ja krotomatografiamenetelmillä olisi käytettävä vertailuaineita.

1.4 TESTIN SOVELLUSALA

Menetelmää voidaan soveltaa kaikkiin kemiallisiin aineisiin (joita ei ole merkitty merkkiaineella tai jotka on merkitty radioaktiivisella merkkiaineella), joiden analysointiin on olemassa riittävän tarkka ja herkkä menetelmä. Tässä kuvattua menetelmää voidaan soveltaa lievästi haihtuviin, haihtumattomiin, vesiliukoisiin tai veteen liukenemattomiin yhdisteisiin. Menetelmää ei voida soveltaa kemikaaleihin, jotka haihtuvat helposti maaperästä (esimerkiksi savuavat aineet tai orgaaniset liuottimet) ja jotka eivät siis säily maaperässä tässä kuvatuissa testiolosuhteissa.

▼B

1.5 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Hajoamisnopeuden mittaamiseen voidaan käyttää merkittyä tai merkitsemätöntä testiainetta. Merkkiaineen (leiman) käyttö on välttämätöntä tutkittaessa hajoamisreittejä ja määritettäessä massatasetta. ^{14}C on suositeltava merkkiaine, mutta muitakin isotooppeja, kuten ^{13}C:ta, ^{15}N:ta, ^{3}H:ta tai ^{32}P:ta voidaan käyttää. Leiman pitäisi mahdollisuuksien mukaan sijaita molekyylin stabiileimmassa osassa tai osissa ([1]). Testiaineen puhtausasteen tulisi olla vähintään 95 %.

Ennen kuin tehdään testi, joka koskee aerobista ja anaerobista hajoamista maaperässä, testiaineesta täytyy selvittää seuraavat tiedot:

a) vesiliukoisuus (menetelmä A.6);

b) liukoisuus orgaanisiin liuottimiin;

c) höyrynpaine (menetelmä A.4) ja Henryn lain vakio

d) n-oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin (menetelmä A.8);

e) kemiallinen pysyvyys pimeässä (hydrolyysi) (menetelmä C.7);

f) pK_a, jos molekyylilla on taipumus protonoitua tai deprotonoitua [OECD:n ohje 112] (16).

Muita tarpeellisia tietoja saattavat olla tiedot testiaineen myrkyllisyydestä maaperän mikrobeille [testimenetelmät C.21 ja C.22] (16).

Testiaineen sekä sen hajoamistuotteiden määrien mittaamiseen ja tunnistukseen on oltava käytettävissä sopivat analyysimenetelmät (myös uutto-ja puhdistusmenetelmät).

1.6 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Maanäytteet käsitellään testiaineella ja inkuboidaan pimeässä Erlenmeyer-pulloissa tai läpivirtausjärjestelmässä valvotuissa laboratorio-olosuhteissa (lämpötilan ja maaperänäytteen kosteuspitoisuuden ollessa vakio). Maanäytteet uutetaan sopivin väliajoin ja niistä analysoidaan alkutuote ja hajoamistuotteet. Myös helposti haihtuvat hajoamistuotteet kerätään analysoitaviksi sopivien absorptiolaitteiden avulla. Kun käytetään ^{14}C-merkkiainetta, voidaan eri mineralisaationopeudet mitata ottamalla talteen näytteessä kehittynyt $^{14}CO_2$, jolloin massatase sekä muodostuneet maannokseen sitoutuneet jäämät voidaan määrittää.

1.7 LAATUVAATIMUKSET

1.7.1 **Saanto**

Vähintään kahden maanäytteen uutto ja analysointi heti testiaineen lisäämisen jälkeen antaa alustavia tietoja analyysimenetelmän toistettavuudesta ja sen testiaineeseen lisäämisen tasaisuudesta. Saanto testin myöhemmissä vaiheissa saadaan massataseista. Saantojen tulisi olla 90-110 % käytettäessä merkkiainetta (S) ja 70-110 %, kun merkkiainetta ei käytetä (3).

([1]) Jos testiainemolekyyli sisältää esimerkiksi yhden renkaan, tämä rengas täytyy merkitä; jos testiainemolekyyli sisältää kaksi tai useampia renkaita, saatetaan tarvita erillinen testi kunkin merkityn renkaan reitin arvioimiseksi ja tarvittavan tiedon saamiseksi hajoamistuotteiden muodostumisesta.

▼B

1.7.2 **Analyysimenetelmän toistettavuus ja herkkyys**

Analyysimenetelmän toistettavuus (lukuun ottamatta alussa tehtävän uuton tehokkuutta) testiaineen ja hajoamistuotteiden kvantifioinnin osalta voidaan varmistaa kaksoismäärittämällä samasta maannoksesta tehty uute, jota on inkuboitu niin kauan, että hajoamistuotteita on ehtinyt muodostua.

Testiaineen ja hajoamistuotteiden osalta analyysimenetelmän osoitusrajan (LOD) on oltava vähintään 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ maanäytettä (testiaine) tai 1 % käytetystä annoksesta sen mukaan, kumpi on pienempi. Kvantifiointiraja (LOQ) on myös määritettävä.

1.7.3 **Hajoamisreaktiossa saatujen mittaustulosten tarkkuus (luotettavuus)**

Hajoamista kuvaavan käyrän luotettavuudesta saadaan tarvittavat tiedot tekemällä regressioanalyysi testiaineen konsentraatioista ajan funktiona, jolloin voidaan laskea puoliintumisaikojen luottamusvälit (kun reaktio noudattaa näennäistä ensimmäisen asteen kinetiikkaa) tai DT_{50}-arvot sekä tarvittaessa DT_{75}- ja DT_{90}-arvot.

1.8 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.8.1 **Laitteet ja kemialliset reagenssit**

Inkubointijärjestelmänä voi olla staattinen suljettu järjestelmä tai sopiva läpivirtausjärjestelmä (7)(17). Esimerkit maanäytteen inkubointiin soveltuvasta läpivirtausjärjestelmästä ja Erlenmeyer-pullosta ovat kuvissa 1 ja 2. Molemmilla järjestelmillä on omat etunsa ja rajoituksensa (7)(17).

Testiin tarvitaan tavanomaisia laboratoriolaitteita ja erityisesti seuraavia:

— analyyttisiä laitteita, kuten GLC-, HPLC- ja TLC-laitteet, mukaan luettuina radioaktiivisten tai muiden kuin radioaktiivisten merkkiaineiden osoittamiseen soveltuvat järjestelmät tai käänteinen isotooppilaimennusmenetelmä,

— tunnistukseen käytettävät laitteet (esimerkiksi MS-, GC-MS-, HPLC-MS-spektrometri tai NMR-laite),

— nestetuikelaskin,

— hapetin radioaktiivisten aineiden polttamista varten,

— sentrifugi,

— uuttovälineet (esimerkiksi sentrifugiputkia kylmäuuttoa varten ja Soxhlet-uuttolaite jatkuvaa takaisinvirtausuuttoa varten),

— liuosten ja uutteiden konsentrointivälineet (esimerkiksi pyörähaihdutin),

— vesihaude,

— mekaaninen sekoituslaite (esimerkiksi sekoituskone tai pyörivä sekoitin).

▼B

Esimerkiksi seuraavia kemiallisia reagensseja tarvitaan:

— NaOH, analyysilaatu, 2 mol · dm^{-3}, tai muu sopiva emäs (esimerkiksi KOH, etanoliamiini),

— H_2SO_4, analyysilaatu, 0,05 mol · dm^{-3},

— etyleeniglykoli, analyysilaatu,

— kiinteät absorptiomateriaalit, kuten natronkalkki ja polyuretaanitulpat,

— orgaaniset liuottimet, analyysilaatu, kuten asetoni tai metanoli,

— tuikeneste.

1.8.2 **Testiaineen annostelu**

Maanäytteeseen annostelua ja levittämistä varten testiaine voidaan liuottaa (ionipuhdistettuun tai tislattuun) veteen tai tarvittaessa pienimpään mahdolliseen määrään asetonia tai muuta orgaanista liuotinta (6), jossa testiaine on riittävän liukoinen ja stabiili. Valittu liuotin ei kuitenkaan saa vaikuttaa merkittävästi maaperän mikrobien toimintaan (katso kohdat 1.5 ja 1.9.2-1.9.3). Testissä on vältettävä käyttämästä mikrobien toimintaa estävien liuottimien, kuten kloroformin, dikloorimetaanin ja muiden halogenoitujen liuottimien käyttöä.

Testiaine voidaan annostella myös kiinteässä muodossa, esimerkiksi sekoitettuna kvartsihiekkaan (6) tai pieneen maanäytteen osanäytteeseen, joka on ilmakuivattu ja steriloitu. Jos testiaine lisätään liuottimen avulla, liuottimen on annettava haihtua ennen testiainetta sisältävän osanäytteen lisäämistä alkuperäiseen epästeriiliin maanäytteeseen.

Testattaessa yleiskemikaaleja, jotka joutuvat maaperään pääasiassa jätevesilietteen kautta tai maatalouskäytön yhteydessä, testiaine on ensin lisättävä lietteeseen, joka sitten annostellaan maanäytteeseen (katso kohdat 1.9.2 ja 1.9.3).

Kaupallisten valmisteiden käyttäminen testissä ei ole yleensä suositeltavaa. Se voi kuitenkin tulla kysymykseen esimerkiksi heikosti liukenevien testiaineiden kohdalla.

1.8.3 **Maannokset**

1.8.3.1 *Muunnoksen valinta*

Hajoamisreitin määrittämiseksi voidaan käyttää edustavaa maannostyyppiä. Suositeltava maannostyyppi on [FAO:n ja USDA:n luokituksen mukaan (18)] hiekkapitoinen hiesu, silttipitoinen hiesu, hiesu tai hiesupitoinen hiekka, jonka pH on 5,5 - 8,0, orgaanisen hiilen pitoisuus 0,5 - 2,5 % ja mikrobibiomassa vähintään 1 % orgaanisen hiilen kokonaismäärästä (10).

Hajoamisnopeuden määrittämiseksi on lisäksi testattava vähintään kolme erilaista edustavaa maannostyyppiä. Kunkin maannostyypin orgaanisen hiilen pitoisuuden, pH:n, savipitoisuuden ja mikrobibiomassan on oltava erilaiset (10).

▼B

Kaikista maannostyypeistä on tutkittava ainakin rakenne (hiekka-, siltti- ja saviprosentti) [FAO:n ja USDA:n luokituksen mukaan (18)] ja määritettävä pH, kationinvaihtokyky, orgaaninen hiili, bulkkitiheys, vedenpidätyskyky ([1]) ja mikrobibiomassa (vain aerobisissa testeissä). Tulosten tulkinnassa muistakin maannoksen ominaisuuksia koskevista tiedoista voi olla hyötyä. Maannoksen ominaisuuksia voidaan määrittää lähteissä (19), (20), (21), (22) ja (23) suositeltujen menetelmien avulla. Mikrobibiomassa on määritettävä substraatin indusoiman soluhengityksen (SIR) menetelmällä (25)(26) tai muulla vastaavalla menetelmällä (20).

1.8.3.2 *Maanäytteiden kerääminen, käsittely ja varastointi*

Yksityiskohtaiset taustatiedot maanäytteiden keruupaikasta on oltava saatavilla. Tarvittavat tiedot ovat tarkka paikka, kasvipeite, kemikaalikäsittelyt, käsittelyt orgaanisilla ja epäorgaanisilla lannoitteilla, biologisten materiaalien lisääminen tai muu saastuminen. Hajoamistestissä ei pitäisi käyttää maannoksia, joita on käsitelty testiaineella tai sen kanssa rakenteellisesti analogisella aineella edeltävän neljän vuoden aikana (10)(15).

Maa-aineksen on oltava äskettäin maasta otettua (A-horisontista eli ylimmän 20 cm:n kerroksesta), ja sen vesipitoisuuden tulisi olla seulomiseen sopiva. Näytteenottoa muista maannostyypeistä kuin kosteikkoviljelmistä on vältettävä pitkien (> 30 päivää) kuivuus-, jäätymis- tai tulvajaksojen (14) aikana tai heti niiden jälkeen. Maanäytteet on kuljetettava siten, että niiden vesipitoisuus muuttuu mahdollisimman vähän, ja ne on säilytettävä pimeässä ja ilmavassa tilassa. Tähän tarkoitukseen sopii yleensä löyhästi sidottu polyetyleenipussi.

Maanäytteet on käsiteltävä mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Kasvit, maaperän suuremmat eliöt ja kivet on poistettava ennen näytteen seulomista 2 mm:n seulalla, joka poistaa pikkukivet, eläimet ja kasvinosat. Näytteen liiallista kuivaamista ja murskaamista ennen seulontaa on vältettävä (15).

Kun näytteen ottaminen pellolta on talvella vaikeaa (maan ollessa jäässä tai lumikerroksen peitossa), näyte voidaan ottaa maannoserästä, joka on varastoitu kasvihuoneessa kasvipeitteen alla (esimerkiksi ruohon tai ruohon ja apilan sekoituksen alla). Testissä on erittäin suotavaa käyttää juuri kerättyjä näytteitä, mutta jos kerätty ja käsitelty näyte on varastoitava ennen testin alkua, varastointiolosuhteiden on oltava asianmukaiset ja varastointiajan lyhyt (4 ± 2 °C enintään kolmen kuukauden ajan), jotta mikrobien toiminta ei keskeydy ([2]). Biomuuntumiskokeissa käytettävien maanäytteiden keräämistä, käsittelyä ja varastointia koskevat yksityiskohtaiset ohjeet esitetään lähdeviitteissä (8)(10)(15)(26)(27).

([1]) Maannoksen vedenpidätyskyky voidaan mitata joko vedenpidätyslukuna, vedenpidätyskykynä tai imupaineena (pF). Lisätietoja asiasta on liitteessä 1. Testiraportissa on ilmoitettava, onko maannoksen vedenpidätysominaisuudet ja bulkkitiheys määritetty luonnontilaisista vai häiriintyneistä (käsitellyistä) maannosnäytteistä.

([2]) Viimeaikaiset tutkimustulokset osoittavat, että myös lauhkeilta ilmastovyöhykkeiltä kerätyt maannokset voidaan varastoida - 20 °C:ssa yli kolmen kuukauden ajan (28)(29) mikrobien toiminnan siitä merkittävästi häiriintymättä.

▼B

Ennen kuin käsitelty maannos testataan, se on esi-inkuboitava, jotta siinä olevat siemenet saadaan itämään ja voidaan poistaa ja jotta mikrobien aineenvaihdunnan tasapaino ehtii palautua ennalleen, kun näyte siirretään näytteenotto- tai varastointiolosuhteista inkubointiolosuhteisiin. Yleensä riittää 2-28 päivän inkubointijakso, jonka aikana lämpötila- ja kosteusolosuhteet vastaavat varsinaisen testin olosuhteita (15). Yhteenlaskettu varastointi- ja esi-inkubointiaika saa olla enintään kolme kuukautta.

1.9 TESTIN SUORITUS

1.9.1 **Testiolosuhteet**

1.9.1.1 *Testilämpötila*

Koko testijakson aikana maanäytteitä on inkuboitava pimeässä tasaisessa lämpötilassa, joka muistuttaa niitä ilmasto-olosuhteita, joissa testiainetta käytetään tai joissa sen päästöt tapahtuvat. Kaikkien lauhkeissa ilmasto-olosuhteissa maaperään päätyvien testiaineiden lämpötilaksi suositellaan 20 (± 2) ºC. Lämpötilaa on tarkkailtava testin aikana.

Testattaessa kemikaaleja, joiden käyttö tai päästöt tapahtuvat kylmemmissä ilmasto-olosuhteissa (esimerkiksi pohjoisen pallonpuoliskon maissa, syys-/talvikauden aikana), on inkuboitava lisänäytteitä myös alhaisemmassa lämpötilassa (esimerkiksi 10 (± 2) ºC).

1.9.1.2 *Kosteuspitoisuus*

Aerobisissa olosuhteissa tehtävissä hajoamistesteissä maanäytteen kosteuspitoisuuden ([1]) pF-arvoa tulisi säädellä niin, että se on 2,0 - 2,5 (3). Maaperän kosteuspitoisuus ilmoitetaan veden massana kuivan maannoksen massaa kohti, ja sitä on tarkkailtava säännöllisesti (esimerkiksi kahden viikon välein) punnitsemalla inkubointiastiat ja korvaamalla veden menetys lisäämällä näytteeseen vettä (mieluiten steriilisti suodatettua vesijohtovettä). Nestettä lisättäessä testiaineen ja/tai hajoamistuotteiden hävikki haihtumalla ja/tai fotolyysi (jos sitä tapahtuu) on estettävä tai pidettävä mahdollisimman vähäisenä.

Kun hajoamistesti on tehtävä anaerobisissa olosuhteissa ja kosteikkoviljellyissä maanäytteissä, maanäyte kyllästetään vedellä upottamalla se veteen.

1.9.1.3 *Aerobiset inkubaatio-olosuhteet*

Läpivirtausjärjestelmissä aerobiset olosuhteet säilytetään vaihtamalla näyteastian ilma säännöllisin väliajoin tai ilmastamalla jatkuvasti kosteutetulla ilmalla. Erlenmeyer-pulloissa ilmanvaihtoa pidetään yllä diffuusion avulla.

1.9.1.4 *Steriilit aerobiset olosuhteet*

Haluttaessa selvittää abioottisen hajoamisen merkitystä testiaineelle maanäytteet voidaan steriloida (lisätietoja sterilointimenetelmistä on lähdeviitteissä 16 ja 29), käsitellä steriilillä testiaineella (esimerkiksi suodattamalla liuos steriilin suodattimen läpi) ja ilmastaa se kosteutetulla steriilillä ilmalla kohdan 1.9.1.3 mukaisesti. Kosteikkoviljellyissä maanäytteissä maannos ja vesi steriloidaan ja näyte inkuboidaan kohdassa 1.9.1.6 kuvatulla tavalla.

([1]) Maanäyte ei saa olla liian kostea eikä liian kuiva, jotta maaperän pieneliöiden ilmastus ja ravitsemustila pysyy sopivana. Optimaalisen mikrobien kasvun kannalta suositeltava kosteuspitoisuus on 40-60 % vedenpidätyskyvystä ja paine 0,1 - 0,33 bar (6). Jälkimmäinen arvo vastaa pF-arvoja 2,0 - 2,5. Eri maannostyyppien tyypilliset kosteuspitoisuudet esitetään liitteessä 2.

▼B

1.9.1.5 *Anaerobiset inkubaatio-olosuhteet*

Anaerobisten olosuhteiden luomiseksi ja ylläpitämiseksi testiaineella käsitelty maanäyte, joka on inkuboitu aerobisissa olosuhteissa 30 päivän tai yhden puoliintumisajan tai DT_{50}:n ajan (sen mukaan, mihin kuluu vähimmin aikaa) kyllästetään vedellä (1-3 cm:n vesikerros), ja inkubointijärjestelmä huuhdellaan inertillä kaasulla (esimerkiksi typellä tai argonilla) ([1]). Testijärjestelmästä on voitava mitata pH, happipitoisuus ja hapetus-pelkistyspotentiaali, ja siinä on oltava haihtuvien aineiden talteenottolaitteet. Käytettäessä Erlenmeyer-pulloista koostuvaa järjestelmää sen on oltava suljettu, jotta vältetään ilman tunkeutuminen järjestelmään diffuusion kautta.

1.9.1.6 *Kosteikkoviljellyn maanäytteen inkubaatio-olosuhteet*

Testattaessa aineen hajoamista riisin kosteikkoviljelyyn käytetyssä maannoksessa maanäyte upotetaan noin 1-5 cm:n syvyiseen veteen ja testiaine lisätään vesifaasiin (9). Suositeltava maakerroksen paksuus on vähintään 5 cm. Järjestelmän ilmansaannista huolehditaan samaan tapaan kuin aerobisissakin olosuhteissa. Vesikerroksen pH:ta, happipitoisuutta ja hapetus-pelkistyspotentiaalia tarkkaillaan ja ne ilmoitetaan testiselosteessa. Ennen hajoamistestin aloittamista näytettä on esi-inkuboitava vähintään kahden viikon ajan (katso kohta 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Testin kesto*

Nopeutta ja hajoamisreittejä koskevat tutkimukset eivät tavallisesti saa kestää yli 120 päivää ([2]) (3)(6)(8), koska sen jälkeen mikrobien toiminnan odotetaan vähenevän keinotekoisessa laboratoriojärjestelmässä, johon ei tule luonnollista ravinnetäydennystä. Testiä voidaan jatkaa pitempään (esimerkiksi 6 tai 12 kuukautta) (8) silloin kun se on tarpeen testiaineen ja pääasiallisten hajoamistuotteiden muodostumisen ja hajoamisen määrittämiseksi. Tätä pidemmät inkubointiajat on perusteltava testiselosteessa, ja niiden yhteydessä on esitettävä biomassan mittaustulokset inkubointijaksojen aikana ja niiden lopussa.

1.9.2 **Testin suoritus**

Noin 50-200 g maanäytettä (kuivapaino) asetetaan kuhunkin inkubaatiopulloon (katso liitteessä 3 olevat kuvat 1 ja 2) ja maanäyte käsitellään testiaineella käyttäen jotakin kohdassa 1.8.2 kuvattua menetelmää. Jos testiaine annostellaan orgaanisten liuotinten avulla, ne on poistettava näytteestä haihduttamalla. Sen jälkeen maanäyte sekoitetaan huolellisesti lastalla ja/tai ravistamalla pulloa. Jos testi tehdään kosteikkoviljellylle maanäytteelle, maannos ja vesi on sekoitettava huolellisesti testiaineen lisäämisen jälkeen. Käsitellyistä näytteistä on analysoitava pieniä määräosia (esimerkiksi 1 g), jotta voidaan varmistua sen tasaisesta leviämisestä näytteeseen. Vaihtoehtoinen tapa on kuvattu alla.

([1]) Pintamaissa ja jopa jankossa vallitsevat yleensä aerobiset olosuhteet, kuten käy ilmi EY:n rahoittamasta tutkimushankkeesta [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Ruotsi]. Anaerobisia olosuhteita esiintyy vain ajoittain maannosten tulvimisen aikaan rankkasateiden jälkeen tai riisipeltojen kosteikkoviljelyssä.

([2]) Aerobiset testit voidaan lopettaa paljon ennen 120:tä päivää, jos lopullinen hajoamisreitti ja lopullinen mineralisaatio on selkeästi tapahtunut siihen mennessä. Testi voidaan lopettaa 120 päivän kuluttua tai silloin kun vähintään 90 % testiaineesta on hajonnut, mutta vasta silloin kun CO_2:ta on muodostunut vähintään 5 %.

▼B

Annostellaan määrä siten, että se vastaa kasvinsuojeluaineen käyttöohjeissa suositeltua suurinta annostusta ja tasaista leviämistä käytettyyn syvyyteen (esimerkiksi maannoksen ylin 10 cm:n kerros ([1]). Esimerkiksi kemikaaleille, jotka levitetään kasvien lehtiin tai maannoksen päälle ilman, että ne tunkeutuvat kasviin tai maannokseen, sopiva annostelumäärä kuhunkin astiaan lasketaan 2,5 cm:n annostelusyvyyden mukaan. Kemikaaleille, jotka tunkeutuvat maannokseen, sopiva annostelusyvyys on aineen käyttöohjeissa ilmoitettu tunkeutumissyvyys. Yleiskemikaaleille annostus on arvioitava tärkeimmän leviämisreitin mukaan. Jos aineen pääasiallinen leviäminen maannokseen tapahtuu esimerkiksi jätevesilietteen kautta, kemikaali on annosteltava lietteeseen konsentraationa, joka vastaa lietteen ennakoitua konsentraatiota. Maannokseen lisättävän lietteen määrän on vastattava maatalousmaihin tavanomaisesti lisättävää lietemäärää. Jos tämä konsentraatio ei ole riittävä pääasiallisten hajoamistuotteiden havaitsemiseksi, erillisten suuremman konsentraation sisältävien näytteiden inkubointi voi olla hyödyllistä. On kuitenkin syytä välttää liian suuria annosmääriä, koska ne haittaavat maaperän mikrobien toimintaa (katso kohdat 1.5 ja 1.8.2).

Vaihtoehtoisesti myös suurempi maanäyte-erä (esimerkiksi 1-2 kg) voidaan käsitellä testiaineella, sekoittaa seos huolellisesti sopivassa sekoituslaitteessa ja sitten siirtää se pienissä 50-200 g:n annoksissa inkubointipulloihin (esimerkiksi näytekauhan avulla). Käsitellystä maanäyte-erästä on analysoitava testiaine pieninä määräosina (esimerkiksi 1 g) aineen tasaisen leviämisen varmistamiseksi. Tämä menetelmä on suositeltava, koska sen avulla testiaine saadaan levitettyä maanäytteeseen tasaisesti.

Myös käsittelemättömät maanäytteet inkuboidaan samoissa (aerobisissa) olosuhteissa kuin testiaineella käsitellyt näytteet. Näitä näytteitä käytetään biomassan mittaamiseen testien aikana ja niiden lopuksi.

Jos testiaine annostellaan maanäytteeseen orgaanisen liuottimen tai liuottimien avulla, samalla määrällä liuotinta tai liuottimia käsitellyt maanäytteet inkuboidaan samoissa (aerobisissa) olosuhteissa kuin testiaineella käsitellyt näytteet. Näistä näytteistä mitataan biomassa testin aluksi, sen aikana ja sen lopuksi, jotta liuottimen tai liuottimien vaikutus mikrobibiomassaan voidaan tarkistaa.

Pullot, jotka sisältävät käsitellyt maanäytteet, joko kiinnitetään kuvassa 1 esitettyyn läpivirtausjärjestelmään tai suljetaan kuvassa 2 esitettyyn absorptiokolonnilla. (katso liite 3).

([1]) Alkuperäinen konsentraatio pinta-alan perusteella voidaan laskea seuraavasta yhtälöstä:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha]\cdot 10^{6}[mg/kg]}{l[m]\cdot 10^{4}[m^{2}/ha]\cdot d\left[kg_{soil}/m^{3}\right]}$$

C_{soil} = Alkuperäinen konsentraatio maanäytteessä [$mg \cdot kg^{-1}$]

A = Annostus [$kg \cdot ha^{-1}$]; l = maannoksen paksuus tutkittavassa ympäristössä [m]; d = maannoksen kuivabulkkitiheys [$kg \cdot m^{-3}$].

Nyrkkisääntö on, että annostuksella 1 $kg \cdot ha^{-1}$ maannoksen konsentraatioksi tulee noin 1 $mg \cdot kg^{-1}$ kymmenen sentin kerroksena (olettaen, että bulkkitiheys on 1 $g \cdot cm^{-3}$).

▼B

1.9.3 **Näytteenotto ja mittaus**

Rinnakkaiset inkubaatiopullot poistetaan sopivin väliajoin, maanäytteet uutetaan sopivilla liuottimilla, joilla on eri polariteetti, ja niistä analysoidaan testiaine ja/tai hajoamistuotteet. Hyvin suunnitellussa testissä on varauduttava siihen, että joka näytteenottokerralla tarvitaan kaksi pulloa. Myös absorptioliuokset tai kiinteät absorptiomateriaalit poistetaan tietyin väliajoin (7 päivän välein ensimmäisen kuukauden aikana ja sen jälkeen 17 päivän välein) kunkin maanäytteen inkuboinnin aikana ja sen lopuksi, ja niistä analysoidaan haihtuvat hajoamistuotteet. Heti testiaineen annostelun jälkeen (päivän 0 näyte) otetun maanäytteen lisäksi testeihin tulisi sisällyttää ainakin viisi eri väliajoin tehtyä testiä. Näytteenottoajat on valittava siten, että testiaineen hajoamisajat sekä hajoamistuotteiden muodostumis- ja hajoamisajat voidaan määrittää (esimerkiksi 0, 1, 3 ja 7 päivää; 2 ja 3 viikkoa; 1, 2 ja 3 kuukautta).

Käytettäessä ^{14}C-merkkiainetta uuttumattomien radioaktiivisten aineiden määrä määritetään polttamalla, ja kullekin näytteenottoajalle lasketaan massatase.

Anaerobisen ja kosteikkoviljelynäytteen osalta testiaine ja hajoamistuotteet analysoidaan yhdistetystä maa- ja vesifaasista, tai maa- ja vesifaasit erotetaan suodattamalla tai sentrifugoimalla ennen uuttoa ja analyysia.

1.9.4 **Vapaaehtoiset lisätestit**

Aerobisella epästeriilillä testillä, joissa käytetään muita lämpötiloja ja näytteen kosteuspitoisuuksia, voidaan arvioida maaperän lämpötilan ja kosteuspitoisuuden vaikutusta testiaineen ja/tai sen hajoamistuotteiden hajoamisnopeuteen maaperässä.

Uuttumattomia radioaktiivisia aineita voidaan lisäksi yrittää karakterisoida esimerkiksi ylikriittisellä nesteuutolla.

2. **MITTAUSTULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Testiaineen, hajoamistuotteiden, haihtuvien aineiden (vain prosentteina) ja uuttumattomien aineiden määrät on ilmoitettava prosentteina alkuperäisestä konsentraatiosta ja tarvittaessa $mg \cdot kg^{-1}$ maanäytettä (kuivapaino) kutakin näytteenottokertaa kohti. Massatase ilmoitetaan prosenttina alkuperäisestä konsentraatiosta kutakin näytteenottokertaa kohti. Esittämällä testiaineen konsentraatiot ajan funktiona voidaan arvioida aineen hajoamisen puoliintumisaika tai DT_{50}-arvo. Pääasialliset hajoamistuotteet olisi tunnistettava ja niiden konsentraatiot olisi myös esitettävä ajan funktiona, jolloin voidaan määrittää niiden muodostumis- ja hajoamisnopeus. Pääasiallinen hajoamistuote on mikä tahansa tuote, jota esiintyy milloin tahansa testin aikana $\geq$ 10 % testiaineen annoksesta.

Talteen otetut haihtuvat yhdisteet antavat viitteitä testiaineen ja sen hajoamistuotteiden haihtuvuuspotentiaalista maaperässä.

▼B

Tarkemmat puoliintumisaikojen tai DT_{50}-arvojen sekä tarvittaessa DT_{75}- ja DT_{90}-arvojen määritykset on tehtävä asianmukaisen kineettisen mallin mukaisilla laskelmilla. Puoliintumisajan ja DT_{50}-arvojen ilmoittamisen yhteydessä on kuvattava käytetty malli, kinetiikan aste ja määrityskerroin (r^2). Ensimmäisen asteen kinetiikan käyttö on yleensä suositeltavaa paitsi silloin, kun $r^2 < 0,7$. Tarvittaessa laskelmat on tehtävä myös pääasiallisista hajoamistuotteista. Esimerkkejä sopivista malleista on esitetty lähteissä 31-35.

Testattaessa muodostumis- ja hajoamisnopeuksia eri lämpötiloissa hajoamisnopeudet on kuvattava lämpötilan funktiona testissä käytetyn lämpötila-alueen sisällä käyttäen Arrheniuksen lakia muodossa:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = \ln A - \frac{B}{T}$$

missä ln A ja B ovat Y-akselin leikkauspisteestä ja kulmakertoimesta saatavat regressiovakiot suoralle, joka saadaan ln k- ja 1/T-arvon lineaarisen regressioanalyysin tuloksena, k on nopeusvakio lämpötilassa T ja T on lämpötila Kelvin-asteina. Jos aineen hajoamista säätelee mikrobien toiminta, on otettava huomioon lämpötila-alue, jolla Arreheniuksen laki on validi.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Vaikka testit toteutetaan keinotekoisessa laboratoriojärjestelmässä, tulosten perusteella voidaan arvioida testiaineen hajoamisnopeutta sekä hajoamistuotteiden muodostumis- ja hajoamisnopeutta kenttäolosuhteissa (36)(37).

Testiaineen hajoamisreitin tutkimus antaa tietoja siitä, miten aineen rakenne muuttuu maaperässä kemiallisten reaktioiden ja mikrobien toiminnan tuloksena.

3. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot.

Testiaine:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava (josta käy ilmi leiman sijainti käytettäessä radioaktiivista merkkiainetta) ja merkitykselliset fysiko-kemialliset ominaisuudet (katso kohta 1.5),

— testiaineen puhtaus (epäpuhtaudet),

— merkkiaineena käytetyn kemikaalin radiokemiallinen puhtaus ja spesifinen aktiivisuus (tarvittaessa).

Vertailuaineet:

— hajoamistuotteen karakterisointiin ja/tai tunnistukseen käytettävän vertailuaineen kemiallinen nimi ja rakenne.

Testimaannokset:

— keruupaikkaa koskevat tiedot,

— näytteenottopäivä ja -menetelmä,

▼B

— maannosten ominaisuudet, kuten pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, rakenne (hiekka-, siltti- ja saviprosentti), kationinvaihtokyky, bulkkitiheys, vedenpidätysominaisuudet ja mikrobibiomassa,

— jos maannosta on varastoitu, varastointiaika ja varastointiolosuhteet.

Testiolosuhteet:

— testien suorituspäivämäärät,

— testiaineen annosteltu määrä,

— käytetyt liuottimet ja testiaineen annostelutapa,

— käsitellyn maanäytteen alkuperäinen paino ja sen paino kullakin näytteenottokerralla,

— kuvaus käytetystä inkubointijärjestelmästä,

— ilman virtausnopeus (vain läpivirtausjärjestelmien osalta),

— koejärjestelmän lämpötila,

— maanäytteen kosteuspitoisuus inkuboinnin aikana,

— mikrobibiomassa aerobisten testien aluksi, niiden aikana ja niiden lopuksi,

— pH, happikonsentraatio ja hapetus-pelkistyspotentiaali anaerobisten testien ja kosteikkoviljeltyjen näytteiden testien aluksi, niiden aikana ja niiden lopuksi,

— erotusmenetelmä(t),

— testiaineen ja pääasiallisten hajoamistuotteiden kvantifiointi- ja tunnistusmenetelmät maanäytteissä ja absorptiomateriaaleissa,

— rinnakkaisnäytteiden ja kontrollinäytteiden määrä.

Tulokset:

— mikrobien aktiivisuuden määritystulos,

— käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus ja herkkyys,

— saanto (validin testin prosenttiarvot on esitetty kohdassa 1.7.1),

— tulokset taulukkomuodossa, ilmoitetaan prosentteina alkuperäisestä annoksesta ja tarvittaessa $mg \cdot kg^{-1}$ maanäytettä (kuivapaino),

— massatase testien aikana ja niiden lopuksi,

— maannoksen uuttumattoman (sitoutuneen) radioaktiivisuuden tai jäämien karakterisointi,

— vapautuneen CO_2:n ja muiden helposti haihtuvien yhdisteiden määritys,

— testiaineen ja tarvittaessa pääasiallisten hajoamistuotteiden konsentraatiot maanäytteessä esitettynä ajan funktiona,

— testiaineen ja tarvittaessa pääasiallisten hajoamistuotteiden puoliintumisaika tai DT_{50}-, DT_{75}- ja DT_{90}-arvot luottamusvälein,

▼B

— arvio abioottisen hajoamisen nopeudesta steriileissä olosuhteissa,

— arvio testiaineen ja tarvittaessa pääasiallisten hajoamistuotteiden hajoamiskinetiikasta,

— arvio oletetuista hajoamisreiteistä tarvittaessa,

— tulosten pohdinta ja tulkinta,

— käsittelemättömät tulokset (esimerkiksi näytteestä saadut kromatogrammit, hajoamisnopeutta koskevat laskelmat ja hajoamistuotteiden tunnistusmenetelmät).

4. **LÄHDELUETTELO**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality — Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, toim.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation Studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italia, 18.-20. tammikuuta 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. Teoksessa Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, toim.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Annex V to Dir. 67/548/EEC

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. Teoksessa Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, toim. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, toim. Agronomy Series No 9, 2. painos.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, toim. Agronomy Series No 9, 2. painos.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. 1. painos.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of soils for pesticide experiments. Teoksessa Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, toim. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. Teoksessa Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. Teoksessa Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some Chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. Teoksessa ”Environmental Dynamics of Pesticides”. R. Haque and V.H. Freed, toim., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. Teoksessa Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, toim.), Academic Press, 83-122.

▼B

LIITE 1

VEDEN JÄNNITYS, KENTTÄKAPASITEETTI (FC) JA VEDENPIDÄTYSKYKY (WHC) [1]

Vesipatsaan korkeus [cm]	PF [a]	bar [b]	Huomautuksia
10^7	7	10^4	kuiva maannos
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	lakastumisraja
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	kenttäkapasiteetin alue [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	vedenpidätyskyky (arvio)
1	0	0,001	vedellä kyllästetty maannos

[a] pF = vesipatsaan korkeuden (cm) logaritmi.
[b] 1 bar= 10^5 Pa.
[c] Vastaa noin 10 %:n vesipitoisuutta hiekassa, 35 %:n hiesussa ja 45 %:n savessa.
[d] Kenttäkapasiteetti ei ole vakio, vaan vaihtelee maannostyypin mukaan pF-arvojen 1,5 ja 2,5 välillä.

Veden jännitys mitataan vesipatsaan korkeutena (cm) tai baareina. Imupaineen laajan vaihtelun vuoksi jännitys ilmaistaan yksinkertaisesti pF-arvona, joka vastaa vesipatsaan korkeuden (cm) logaritmia.

Kenttäkapasiteetti on veden määrä, joka voi varastoitua ilmakehän paineessa luonnonmaannokseen 2 päivän kuluessa pitkästä sadejaksosta tai riittävästä kastelusta. Tämä arvo määritetään luonnontilaisesta maannoksesta tutkittavassa ympäristössä. Mittausta ei siis voida soveltaa käsiteltyihin maanäyte-eriin laboratorio-olosuhteissa. FC-arvoissa, jotka on määritetty käsiteltyjen maanäytteiden perusteella, voi esiintyä suurta järjestelmällistä vaihtelua.

Vedenpidätyskyky (WHC) määritetään laboratoriossa sekä luonnontilaisesta että käsitellystä maannoksesta kyllästämällä maapatsas vedellä kapillaari-ilmiön avulla. Tämä arvo on erityisen käyttökelpoinen käsiteltyjen maannosten yhteydessä ja se voi olla jopa 30 % suurempi kuin kenttäkapasiteetti (1). Se on myös kokeellisesti helpompi määrittää kuin luotettava FC-arvo.

Huomautukset

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

LIITE 2

ERILAISTEN MAANNOSTYYPPIEN KOSTEUSPITOISUUDET (g vettä per 100 g kuivaa maannosta) ERI VALTIOISSA

Maannos	Valtio	Maannoksen kosteuspitoisuus arvolla		
		WHC (1)	pF= 1,8	pF = 2,5
Hiekka	Saksa	28,7	8,8	3,9
Hiesupitoinen hiekka	Saksa	50,4	17,9	12,1
Hiesupitoinen hiekka	Sveitsi	44,0	35,3	9,2
Silttipitoinen hiesu	Sveitsi	72,8	56,6	28,4
Savipitoinen hiesu	Brasilia	69,7	38,4	27,3
Savipitoinen hiesu	Japani	74,4	57,8	31,4
Hiekkapitoinen hiesu	Japani	82,4	59,2	36,0
Silttipitoinen hiesu	USA	47,2	33,2	18,8
Hiekkapitoinen hiesu	USA	40,4	25,2	13,3

(1) Vedenpidätyskyky

▼B

LIITE 3

Kuva 1

Esimerkki läpivirtausjärjestelmästä, jolla tutkitaan kemikaalien hajoamista maannoksessa ([1]) ([2])

1: neulaventtiili

2: vettä sisältävä kaasunpesupullo

3: ultramembraani (vain steriileissä olosuhteissa), huokoskoko 0,2 µm

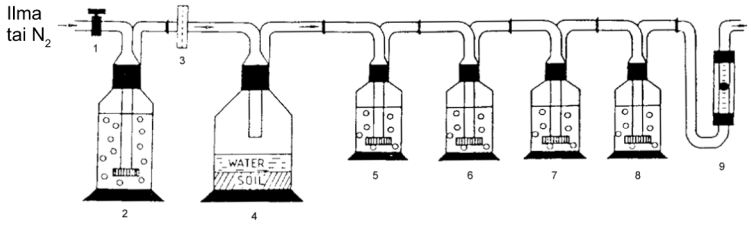
4: maannoksen aineenvaihduntapullo (vedellä kyllästetty vain testattaessa anaerobisia ja kosteikkoviljelyolosuhteita)

5: etyleeniglykolilukko orgaanisia helposti haihtuvia yhdisteitä varten

6: rikkihappolukko emäksisiä helposti haihtuvia yhdisteitä varten

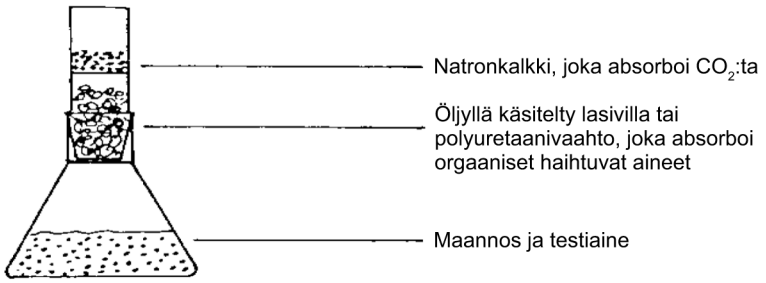
7, 8: natriumhydroksidilukko CO_2:ta ja muita happamia helposti haihtuvia yhdisteitä varten

9: virtausmittari



Kuva 2

Esimerkki Erlenmeyer-pullosta, jolla tutkitaan kemikaalien hajoamista maannoksessa ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. Teoksessa Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, toim.), Academic Press, 123–157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. Teoksessa Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, toim. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

▼B

C.24. AEROBINEN JA ANAEROBINEN HAJOAMINEN VESIYMPÄRISTÖN SEDIMENTTIJÄRJESTELMISSÄ

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 308 (2002).

1.1 JOHDANTO

Kemikaalit voivat päästä mataliin tai syviin pintavesiin esimerkiksi suoraan annosteltuina, lentosumutuksen yhteydessä, valumana sekä viemäröinnin, jätteiden käsittelyn, teollisuuden, kotitalouden tai maanviljelyn päästöinä ja ilmakehän laskeumina. Kuvatun testimenetelmän tarkoitus on arvioida laboratorio-olosuhteissa orgaanisten kemikaalien aerobista ja anaerobista hajoamista vesiympäristön sedimenttijärjestelmissä. Menetelmä perustuu aikaisempiin ohjeisiin (1)-(2)(3)(4)(5)(6). Belgiratessa Italiassa vuonna 1995 pidetyssä maannosten ja sedimenttien valintaa käsitelleessä OECD:n työryhmän kokouksessa sovittiin erityisesti tässä testissä käytettävien sedimenttien lukumäärästä ja tyypeistä (7). Työryhmä esitti myös sedimenttinäytteiden keräämiseen, käsittelyyn ja varastointiin liittyviä suosituksia, jotka perustuvat ISO:n ohjeisiin (8). Testit ovat pakollisia kemikaaleille, jotka tarkoituksella tai todennäköisesti päätyvät vesiympäristöön edellä mainituilla tavoilla.

Luonnollisten vesiympäristön sedimenttijärjestelmien olosuhteet ovat usein aerobiset ylemmässä vesifaasissa. Sedimentin pintakerros voi olla joko aerobinen tai anaerobinen, kun taas syvemmällä sijaitseva sedimenttikerros on yleensä anaerobinen. Kaikkien näiden vaihtoehtojen huomioon ottamiseksi tässä asiakirjassa selostetaan sekä aerobisia että anaerobisia testejä. Aerobisessa testissä simuloidaan aerobista vesipatsasta, jonka alla on aerobinen sedimenttikerros ja sen alla anaerobinen gradientti. Anaerobisessa testissä simuloidaan täysin anaerobista vesi-sedimenttijärjestelmää. Jos olosuhteet edellyttävät merkittävää poikkeamista näistä suosituksista, esimerkiksi sedimentistä otettujen käsittelemättömien kairausnäytteiden tai testiaineelle mahdollisesti altistuneiden sedimenttien käyttöä, voidaan käyttää muita testimenetelmiä (9).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kaikissa tapauksissa on käytettävä kansainvälisen SI-standardin mukaisia yksikköjä.

Testiaine: mikä tahansa aine, joko alkutuote tai merkitykselliset hajoamistuotteet.

Hajoamistuotteet: kaikki aineet, jotka syntyvät testiaineen bioottisista tai abioottisista hajoamisreaktioista, mukaan luettuina CO_2 ja tuotteet, jotka ovat sitoutuneissa jäämissä.

Sitoutuneet jäämät: maaperässä, kasveissa tai eläimissä esiintyvät yhdisteet, jotka uuttamisen jälkeen säilyvät matriisissa alkutuotteen tai sen metaboliitin/hajoamistuotteen muodossa. Uuttomenetelmä ei saa olennaisesti muuttaa itse yhdisteitä tai matriisin rakennetta. Sidoksen luonnetta voidaan osittain selventää matriisia muuttavilla uuttomenetelmillä ja kehittyneillä analyysitekniikoilla. Tähän mennessä on tunnistettu esimerkiksi kovalenttisia ioni- ja sorptiosidoksia sekä eri materiaalien sisään jääneitä aineita (sulkeuma-aineita) tällä menetelmällä. Yleisesti voidaan todeta, että sitoutuneiden jäämien muodostuminen vähentää aineen biologista saatavuutta ja käytettävyyttä merkittävästi (10) [vuodelta 1984 olevaan IUPAC-nimikkeistöön tehty muutos (11)].

▼B

Aerobinen hajoaminen (muuntuminen): reaktiot, jotka tapahtuvat molekyylisen hapen läsnäollessa (12).

Anaerobinen hajoaminen: reaktiot, joihin ei osallistu molekyylistä happea (12).

Luonnonvedet: esimerkiksi lammista, joista ja virroista saadut pintavedet.

Sedimentti: sekoitus mineraalisia ja orgaanisia kemiallisia aineksia, joista jälkimmäiset sisältävät paljon hiiltä ja typpeä sisältäviä suurimolekyylisiä aineita. Sedimentti kerrostuu luonnonvesiin ja muodostaa rajapinnan veteen.

Mineralisaatio: orgaanisen yhdisteen täydellinen hajoaminen CO_2:ksi ja H_2O:ksi aerobisissa olosuhteissa sekä CH_4:ksi, CO_2:ksi ja H_2O:ksi anaerobisissa olosuhteissa. Kun käytetään leimana ^{14}C:ta tässä testimenetelmässä, mineralisaatio tarkoittaa laajaa hajoamista, jonka aikana leimattu hiiliatomi hapettuu tai pelkistyy ja vapauttaa vastaavan määrän $^{14}CO_2$:ta tai CH^4:ää.

Puoliintumisaika: $t_{0,5}$ on aika, joka kuluu testiaineen 50-prosenttiseen hajoamiseen tapauksissa, joissa hajoaminen voidaan kuvata ensimmäisen asteen kinetiikan avulla. Puoliintumisaika ei riipu konsentraatiosta.

Häviämisaika 50 (DT_{50}): aika, jonka kuluessa testiaineen konsentraatio vähenee 50 %:lla.

Häviämisaika 75 (DT_{75}): aika, jonka kuluessa testiaineen konsentraatio vähenee 75 %:lla.

Häviämisaika 90 (DT_{90}): aika, jonka kuluessa testiaineen konsentraatio vähenee 90 %:lla.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita on käytettävä hajoamistuotteiden karakterisointiin ja/tai tunnistukseen spektroskopia- ja krotomatografiamenetelmillä.

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Hajoamisnopeuden mittaamiseen voidaan käyttää leimattua tai leimaamatonta testiainetta, vaikka leimatun aineen käyttöä suositellaan. Merkkiaineen käyttö on välttämätöntä tutkittaessa hajoamisreittejä ja määritettäessä massatasetta. ^{14}C on suositeltava leima, mutta muitakin isotooppeja, kuten ^{13}C:ta, ^{15}N:ta, ^{3}H:ta tai ^{32}P:ta, voidaan käyttää. Leiman pitäisi mahdollisuuksien mukaan sijaita molekyylin stabiileimmassa osassa tai osissa ([1]). Testiaineen kemiallisen ja/tai radiokemiallisen puhtausasteen on oltava vähintään 95 %.

Ennen testin tekemistä testiaineesta on oltava saatavilla seuraavat tiedot:

(a) vesiliukoisuus (menetelmä A.6);

(b) liukoisuus orgaanisiin liuottimiin;

(c) höyrynpaine (menetelmä A.4) ja Henryn lain vakio;

([1]) Jos testiaine sisältää esimerkiksi yhden renkaan, tämä rengas täytyy merkitä; jos testiaine sisältää kaksi tai useampia renkaita, saatetaan tarvita erillinen testi kunkin merkityn renkaan reitin arvioimiseksi ja tarvittavan tiedon saamiseksi hajoamistuotteiden muodostumisesta.

▼B

(d) n-oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin (menetelmä A.8);

(e) adsorptiokerroin (K_d, K_f tai K_{oc}, tapauksen mukaan) (menetelmä C. 18);

(f) hydrolyysi (menetelmä C.7);

(g) dissosiaatiovakio (pK_a) [OECD:n ohje 112] (13);

(h) testiaineen kemiallinen rakenne ja merkkiaineen isotoopin sijainti, jos merkkiainetta käytetään.

Huomautus: Raportissa on ilmoitettava lämpötila, jossa mittaukset on tehty.

Muita tarpeellisia tietoja saattavat olla tiedot testiaineen myrkyllisyydestä mikrobeille, tiedot nopeasta ja/tai inherentistä biologisesta hajoavuudesta sekä tiedot testiaineen aerobisesta ja anaerobisesta hajoamisesta maaperässä.

Käytettävissä on oltava analyysimenetelmät (myös uutto- ja puhdistusmenetelmät) testiaineen sekä sen hajoamistuotteiden kvantifioimiseksi ja tunnistamiseksi vedestä ja sedimentistä (katso kohta 1.7.2).

1.5 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tässä kuvatussa menetelmässä käytetään yhtä aerobista ja yhtä anaerobista vesiympäristön sedimenttijärjestelmää (katso liite 1), jolloin voidaan

i) mitata testiaineen muuttumisnopeus vesi-sedimenttijärjestelmässä;

ii) mitata testiaineen muuttumisnopeus sedimentissä;

iii) mitata testiaineen ja/tai sen hajoamistuotteiden mineralisaationopeus (kun leimana on ^{14}C);

(iv) tunnistaa ja määrittää hajoamistuotteet vesi- ja sedimenttifaasissa, mukaan luettuna massatase (kun käytetään merkkiainetta);

(v) mitata testiaineen ja sen hajoamistuotteiden jakautuminen kahteen faasiin pimeässä (esimerkiksi leväkukinnan välttämiseksi) tietyn inkubaatiojakson aikana vakiolämpötilassa. Puoliintumisajat, DT_{50}-, DT_{75}- ja DT_{90}-arvot määritetään, jos mittaustulokset sallivat sen, mutta arvoja ei pidä ekstrapoloida pitkälle koejakson yli (katso kohta 1.2).

Sekä aerobiseen että anaerobiseen tutkimukseen tarvitaan vähintään kaksi sedimenttinäytettä ja näytteet niihin kuuluvista vesistä (7). Joissakin tapauksissa voi kuitenkin olla tarpeen käyttää useampia kuin kahta vesiympäristön sedimenttiä, esimerkiksi jos kemikaali voi esiintyä makean veden ympäristössä ja/tai merivesiympäristössä.

▼B

1.6 TESTIN SOVELLUSALA

Menetelmää voidaan soveltaa kaikkiin kemiallisiin aineisiin (leimaamattomiin tai radioaktiivisella isotoopilla leimattuihin), joiden analysoimiseen on riittävän tarkka ja herkkä menetelmä. Tässä kuvattua menetelmää voidaan soveltaa lievästi haihtuviin, haihtumattomiin, vesiliukoisiin tai veteen liukenemattomiin yhdisteisiin. Menetelmää ei voida soveltaa kemikaaleihin, jotka haihtuvat helposti vedestä (esimerkiksi savuavat aineet tai orgaaniset liuottimet) ja jotka eivät siis säily vedessä ja/tai sedimentissä tässä kuvatuissa testiolosuhteissa.

Tähän mennessä menetelmällä on tutkittu kemikaalien muuntumista makeassa vedessä ja sedimenteissä, mutta periaatteessa menetelmää voidaan soveltaa jokisuisto- ja meriympäristöihin. Menetelmä ei sovellu virtaavien vesien, kuten jokien, tai avomeren olosuhteiden simulointiin.

1.7 LAATUVAATIMUKSET

1.7.1 **Saanto**

Vähintään kahden maaperänäytteen uutto ja analysointi heti testiaineen lisäämisen jälkeen antaa alustavia tietoja analyysimenetelmän toistettavuudesta ja sen testiaineeseen lisäämisen tasaisuudesta. Saanto testin myöhemmissä vaiheissa määritetään vastaavan massataseen mukaan. Saantojen tulisi olla 90-110 % käytettäessä merkkiainetta (6) ja 70-110 %, kun merkkiainetta ei käytetä.

1.7.2 **Analyysimenetelmän toistettavuus ja herkkyys**

Analyysimenetelmän toistettavuus (lukuun ottamatta alussa tehtävän uuton tehokkuutta) testiaineen ja hajoamistuotteiden määritysten osalta voidaan tarkistaa kaksoismäärittämällä samasta vesi- tai sedimenttinäytteestä tehty uute, jota on inkuboitu niin kauan, että hajoamistuotteita on ehtinyt muodostua.

Testiaineen ja hajoamistuotteiden osalta analyysimenetelmän osoitusrajan (LOD) on oltava vähintään 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ vesi- tai sedimenttinäytettä (testiaine) tai 1 % käytetystä annoksesta sen mukaan, kumpi on pienempi. Määritysraja (LOQ) on myös määritettävä.

1.7.3 **Hajoamistesteissä saatujen tulosten luotettavuus**

Tiedot hajoamista kuvaavan käyrän luotettavuudesta saadaan tekemällä regressioanalyysi testiaineen konsentraatioista ajan funktiona, jolloin voidaan laskea puoliintumisaikojen luottamusvälit (näennäisen ensimmäisen asteen kinetiikan osalta) tai DT_{50}-arvot sekä tarvittaessa DT_{75}- ja DT_{90}-arvot.

1.8 MENETELMÄN KUVAUS

1.8.1 **Testijärjestelmä ja -laitteet**

Testi on suoritettava lasiastioissa (esimerkiksi pulloissa tai sentrifugiputkissa), paitsi jos esitiedot (kuten n-oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin tai sorptiotiedot) osoittavat, että testiaine saattaa kiinnittyä lasiin; tällöin voidaan harkita jonkin muun materiaalin, esimerkiksi teflonin, käyttöä. Jos testiaineen tiedetään kiinnittyvän lasiin, ongelmaa voidaan helpottaa yhdellä tai usealla seuraavista tavoista:

▼B

— Määritetään lasiin kiinnittyneen testiaineen ja hajoamistuotteiden massa.

— Pestään kaikki lasitavarat liuottimella testin päätyttyä.

— Käytetään kaupallisia valmisteita (katso myös kohta 1.9.2).

— Lisätään testiaine järjestelmään lisäliuottimen avulla; tällöin lisäliuottimen on oltava aine, joka ei aiheuta testiaineen hajaantumista.

Esimerkkejä tyypillisistä testilaitteista, eli läpivirtaus- ja Erlenmeyer-tyyppisistä järjestelmistä, on liitteissä 2 ja 3 (14). Muita käyttökelpoisia inkubointijärjestelmiä on esitetty lähteessä 15. Testilaitteiston on oltava rakenteeltaan sellainen, että ilman tai typen vaihto ja helposti haihtuvien tuotteiden talteenotto on mahdollista. Laitteiston mittojen täytyy täyttää testivaatimukset (katso kohta 1.9.1). Ilmanvaihto voidaan järjestää joko varovaisena kuplailmastuksena tai viemällä ilmaa tai typpeä veden pinnalle. Jälkimmäisessä tapauksessa on suositeltavaa sekoittaa vettä varovasti ylhäältäpäin, jotta happi tai typpi leviäisi paremmin veteen. CO_2:ta sisältämätöntä ilmaa ei pidä käyttää, koska se saattaa nostaa veden pH-arvoa. Molemmissa tapauksissa sedimentin häiritseminen ei ole suotavaa, ja sitä pitää mahdollisuuksien mukaan välttää. Haihtuvat kemikaalit on testattava Erlenmeyer-tyyppisessä järjestelmässä sekoittamalla veden pintaa varovasti. Voidaan myös käyttää suljettuja säiliöitä, joiden ilmatilassa on joko ilmakehän ilmaa tai typpeä ja astiat helposti haihtuvien aineiden talteen ottamiseksi (16). Aerobisessa testissä vaatimuksena on ilmatilan kaasun säännöllinen vaihtuminen, jolla kompensoidaan biomassan hapenkulutusta.

Sopivia erottimia helposti haihtuvien hajoamistuotteiden keräämiseen ovat muun muassa, mutta eivät ainoastaan, kaliumhydroksidi- tai natriumhydroksidiliuokset (1 mol · dm^{-3}) hiilidioksidin ([1]) keräämiseen sekä etyleeniglykoli, etanoliamiini tai ksyleeniin liuotettu 2-prosenttinen parafiini orgaanisten yhdisteiden keräämiseen. Anaerobisissa olosuhteissa muodostuneet helposti haihtuvat aineet, kuten metaani, voidaan kerätä esimerkiksi molekyyliseulalla. Tällaiset helposti haihtuvat aineet voidaan hapettaa esimerkiksi CO_2:ksi viemällä kaasu CuO:lla täytetyn kvartsiputken läpi 900 °C:n lämpötilassa ja erottamalla muodostunut CO_2 absorboivaan emäksiseen aineeseen (17).

Testiaineen ja sen hajoamistuotteiden kemiallista analyysia varten tarvitaan laboratoriolaitteita (esimerkiksi GLC eli kaasu-nestekromatograafi, HPLC eli korkean suorituskyvyn nestekromatograafi ja TLC eli ohutlevykromatografialaite, MS eli massaspektrometri tai GC-MS eli kaasukromatograafi-massaspektrometri tai NMR eli ydinmagneettiseen resonanssiin perustuva tutkimuslaite) sekä detektiojärjestelmät radioaktiivisia merkkiaineita sisältäville tai leimaamattomille kemikaaleille. Käytettäessä radioaktiivisia merkkiaineita tarvitaan myös nestetuikelaskin ja poltto- eli hapetinlaite (sedimenttinäytteiden polttamiseen ennen radioaktiivisten aineiden analyysia.

Testissä voidaan tarvita myös muita tavanomaisia laboratoriolaitteita fysikaalis-kemiallisiin tai biologisiin määrityksiin (katso taulukko 1, kohta 1.8.2.2), lasitavaraa, kemikaaleja ja reagensseja.

([1]) Koska nämä emäksiset absorptioliuokset imevät myös tuuletusilman hiilidioksidin sekä aerobisissa testeissä soluhengityksen tuloksena syntyneen hiilidioksidin, ne on vaihdettava säännöllisesti, jotta vältetään niiden kyllästyminen ja siitä seuraava absorptiokyvyn menettäminen.

▼B

1.8.2 **Vesiympäristön sedimenttien valinta ja määrä**

Näytteenottopaikat on kaikissa tilanteissa valittava testin tarkoituksen mukaan. Näytteenottopaikkojen valinnassa on otettava huomioon valuma-alueen ja yläjuoksun mahdolliset maanviljely-, teollisuus- tai kotitaloussyötteet. Testissä ei saa käyttää sedimenttejä, jotka ovat altistuneet testiaineelle tai sen kanssa rakenteellisesti analogiselle aineelle viimeisten neljän vuoden aikana.

1.8.2.1 *Sedimentin valinta*

Aerobisissa testeissä käytetään tavallisesti kahta sedimenttiä (7). Valittujen kahden sedimentin on poikettava toisistaan orgaanisen hiilen pitoisuuden ja rakenteen osalta. Yhdessä sedimentissä on oltava suuri orgaanisen hiilen pitoisuus (2,5 - 7,5 %) ja hieno rakenne, toisessa taas pieni orgaanisen hiilen pitoisuus (0,5 - 2,5 %) ja karkea rakenne. Orgaanisen hiilen pitoisuuksien eron pitäisi yleensä olla vähintään 2 %. ”Hieno rakenne” merkitsee määritelmän mukaan > 50 %:n [savi + siltti] ([1]) -pitoisuutta, ja ”karkea rakenne” merkitsee < 50 %:n [savi + siltti]-pitoisuutta. Kahden sedimentin [savi + siltti]-pitoisuuden välisen eron pitäisi yleensä olla vähintään 20 %. Jos kemikaali saattaa päästä myös merivesiin, vähintään yhden vesiympäristösedimenttijärjestelmän on oltava peräisin merestä.

Pelkässä anaerobisessa testissä näytteet on otettava kahdesta sedimentistä (ja niihin kuuluvista vesistä) pintavesimassan anaerobiselta alueelta (7). Sekä sedimentti- että vesifaasi on käsiteltävä ja kuljetettava huolellisesti hapettomissa olosuhteissa.

Sedimenttien valintaan saattavat vaikuttaa muutkin parametrit, jotka on harkittava kussakin tapauksessa erikseen. Jos esimerkiksi testataan kemikaaleja, joiden muuntuminen ja/tai sorptio saattaa riippua pH-arvosta, sedimenttien pH-arvoalue on merkitsevä parametri. Sorption pH-riippuvuus saattaa heijastua testiaineen pK_a-arvossa.

1.8.2.2 *Vesi-sedimenttinäytteiden karakterisointi*

Seuraavassa taulukossa on esitetty keskeiset parametrit, jotka on mitattava ja raportoitava (käytetyn menetelmän lisäksi) sekä veden että sedimentin osalta, sekä testin vaihe, jonka kuluessa ne on määritettävä. Näiden parametrien määritysmenetelmät esitetään lähteissä 18, 19, 20 ja 21.

Lisäksi voi olla tarpeen mitata ja raportoida muitakin parametreja tapauskohtaisesti (esimerkiksi makean veden järjestelmistä hiukkaset, emäksisyys, kovuus, sähkönjohtokyky, NO_3/PO_4 (suhde ja erilliset arvot); sedimenteistä kationinvaihtokyky, vedenpidätyskyky, karbonaatti, typen ja fosforin kokonaismäärä; merivesijärjestelmistä suolaisuus). Nitraatin, sulfaatin, biologisesti käyttökelpoisen raudan ja mahdollisesti muiden elektronin vastaanottajien analysoiminen sedimenteistä ja vedestä voi myös olla tarpeen hapetus-pelkistysolosuhteiden arviointia varten, erityisesti anaerobisen muuttumisen osalta.

([1]) [Savi + siltti] on sedimentin mineraaliosa, jonka raekoko on <50 μm.

▼B

Vesi-sedimenttinäytteiden karakterisointiin tarvittavien parametrien mittaaminen (7)(22)(23)

Parametri	Testin vaihe					
	Näytteenotto kentältä	Jälkikäsittely	Akklimatisoitumisen alku	Testin alku	Testin aikana	Testin loppu
Vesi						
Alkuperä/lähde	X					
Lämpötila	X					
pH	X		X	X	X	X
Orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus			X	X		X
O_2-pitoisuus (*)	X		X	X	X	X
Hapetus-pelkistvspotentiaali (*)			X	X	X	X
Sedimentti						
Alkuperä/lähde	X					
Kerroksen paksuus	X					
pH		X	X	X	X	X
Partikkelien kokojakauma		X				
Orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus		X	X	X		X
Mikrobibiomassa (*)		X		X		X
Hapetus-pelkistyspotentiaali (**)	Havainnot (väri/haju)		X	X	X	X

(*) Aerobisissa tutkimuksissa mikrobien hengitysnopeusmenetelmä (26), savutusmenetelmä (27) tai pesäkkeiden laskeminen Petri-maljassa (esimerkiksi bakteerit, aktinomykeetit eli sädesienet, sienet ja pesäkkeiden kokonaismäärä); anaerobisissa tutkimuksissa metaanin muodostumisnopeus.

(**) Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että veden happipitoisuuden ja hapetus-pelkistyspotentiaalin mittauksilla ei ole sen paremmin mekanistista kuin ennustavaa arvoa, kun kysymys on pintavesien mikrobipopulaatioiden kasvusta ja kehityksestä (24)(25). Parempia välineitä aerobisen biomuuntumisen nopeuden ja reittien tulkintaan ja arvioimiseen voivat olla biokemiallinen hapenkulutus (näytteenoton yhteydessä sekä testin alussa ja lopussa mitattuna) sekä hivenaineiden/makroravinteiden Ca, Mg ja Mn konsentraatiot (testin alussa ja lopussa) vedessä sekä N:n ja P:n kokonaismäärät sedimentissä (näytettä otettaessa sekä testin lopussa).

1.8.3 **Näytteiden kerääminen, käsittely ja varastointi**

1.8.3.1 *Kerääminen*

Sedimenttinäytteitä otettaessa on sovellettava ISO:n pohjasedimenttinäytteiden ottamista koskevaa alustavaa ohjetta (S). Sedimenttinäytteet on otettava sedimentin ylimmästä kerroksesta (5-10 cm ylärajasta) koko kerroksen alueelta. Sedimenttiin kuuluvat vesinäytteet on kerättävä samasta paikasta ja samaan aikaan kuin sedimenttinäytekin. Anaerobisia tutkimuksia varten sedimenttinäyte ja siihen kuuluva vesinäyte on otettava ja kuljetettava hapettomissa olosuhteissa (28)-(katso kohta 1.8.2.1). Joitakin näytteenottovälineitä kuvataan lähteissä (8)(23).

▼B

1.8.3.2 *Käsittely*

Sedimentti erotetaan vedestä suodattamalla ja märkäseulotaan 2 mm:n seulalla käyttäen ylimäärää tutkimuspaikalta otettua vettä, joka sitten heitetään pois. Tunnetut määrät sedimenttiä ja vettä sekoitetaan halutussa suhteessa (katso kohta 1.9.1) inkubointipulloissa ja valmistellaan akklimatisaatiojaksoa varten (katso kohta 1.8.4). Kun kyseessä on anaerobinen tutkimus, kaikki käsittelyn vaiheet on tehtävä hapettomissa olosuhteissa (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3 *Varastointi*

Sedimentti- ja vesinäytteet on mieluiten käytettävä juuri kerättyinä, mutta jos näytteiden varastointi on välttämätöntä, sedimentti ja vesi on seulottava edellä kuvatulla tavalla ja varastoitava yhdessä vedellä kyllästettynä (6-10 cm:n vesikerroksessa) pimeässä, 4 ± 2 °C ([1]) -asteen lämpötilassa enintään neljän viikon ajan (7)(8)(23). Aerobisiin tutkimuksiin tarkoitetut näytteet on varastoitava niin, että ilmaa on vapaasti saatavilla (esimerkiksi avoimissa säiliöissä); anaerobisiin tutkimuksiin tarkoitetut näytteet puolestaan on varastoitava hapettomissa olosuhteissa. Kuljetuksen ja varastoinnin aikana sedimentti- ja vesinäytteet eivät saa jäätyä eikä sedimentti kuivua.

1.8.4 **Sedimentti- ja vesinäytteiden valmistelu testiä varten**

Ennen testiaineen lisäämistä näytteen on käytävä läpi akklimatisaatiojakso, jonka aikana kukin sedimentti- ja vesinäyte sijoitetaan varsinaisessa testissä käytettävään inkubaatiosäiliöön, ja akklimatisaation on tapahduttava täsmälleen samoissa olosuhteissa kuin testin inkubaatiojakson (katso kohta 1.9.1). Akklimatisaatiojakso on tarpeen, jotta järjestelmä saavuttaa kohtuullisen stabiilin tilan pH:n, veden happikonsentraation, sedimentin ja veden hapetus-pelkistyspotentiaalin sekä faasien makroskooppisen erottumisen osalta. Akklimatisaatiojakson suositeltu kesto on tavallisesti viikosta kahteen viikkoon, kuitenkin enintään neljä viikkoa. Tänä aikana mitatut määritystulokset on raportoitava.

1.9 TESTIN SUORITUS

1.9.1 **Testiolosuhteet**

Testi on suoritettava inkubointilaitteistossa (katso kohta 1.8.1), jossa veden ja sedimentin tilavuuden suhde on 3:1-4:1 ja sedimenttikerroksen paksuus on 2,5 cm (± 0,5 cm). Vähintään 50 g sedimenttiä (kuivapaino) suositellaan laitettavaksi inkubaatiosäiliöön.

Testi on suoritettava pimeässä vakioidussa lämpötilassa, jonka alue voi olla 10-30 °C. Suositeltava lämpötila on 20 ± 2 °C. Tarvittaessa voidaan tapauskohtaisesti käyttää toista, alempaa lämpötilaa (esimerkiksi 10 °C), sen mukaan, millaisia tietoja testistä halutaan saada. Inkubointilämpötilaa on tarkkailtava ja se on raportoitava.

([1]) Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että varastointi 4 °C:n lämpötilassa saattaa vähentää sedimentin orgaanisen hiilen pitoisuutta, mikä puolestaan saattaa vähentää mikrobien toimintaa (34).

▼B

1.9.2 **Testiaineen käsittely ja annostelu**

Testissä käytetään yhtä testiaineen konsentraatiota ([1]). Kun testiaine on suoraan vesimassaan annosteltava kasvinsuojeluaine, aineen käyttöohjeissa oleva enimmäisannos tulkitaan enimmäisannostelumääräksi, joka lasketaan testisäiliössä olevan veden pinta-alan mukaan. Muissa tapauksissa testikonsentraation on perustuttava ympäristöpäästöjen perusteella tehtyihin ennusteisiin. Testiaineen oikea konsentraatio on valittava huolellisesti, jotta voidaan karakterisoida hajoamistuotteiden muodostuminen ja hajoaminen sekä niiden hajoamisreitit. Suurempienkin (esimerkiksi 10-kertaisten) testiaineannosten käyttö voi olla tarpeen tilanteissa, joissa testiaineen konsentraatiot ovat testin alussa lähellä havaitsemisrajaa ja/tai joissa pääasiallisia hajoamistuotteita ei voida helposti havaita, kun niiden osuus on 10 % testiaineen annostelumäärästä. Jos käytetään suurempia testiaineen konsentraatioita, ne eivät saa merkittävästi haitata vesi-sedimenttijärjestelmän mikrobien toimintaa. Jotta testiaineen konsentraatio erikokoisissa säiliöissä olisi sama, testiaineen määrää voidaan mukauttaa säiliön vesipatsaan syvyyden mukaan suhteessa veden syvyyteen tutkittavassa ympäristössä (oletusarvo on 100 cm, mutta muitakin syvyyksiä voidaan käyttää). Esimerkkilaskelma on liitteessä 4.

Ihannetapauksessa testiaine annostellaan vesiliuoksena testijärjestelmän vesifaasiin. Pakottavista syistä testiaineen annostelussa ja levittämisessä voidaan käyttää pieniä määriä veteen sekoittuvia liuottimia (esimerkiksi asetonia ja etanolia), mutta niiden määrä ei saa olla enempää kuin 1 % v/v, eivätkä ne saa haitata testijärjestelmän mikrobien toimintaa. Testiaineen vesiliuos on valmistettava huolella; täydellisen homogeenisyyden varmistamiseksi voi olla tarpeen käyttää kehitinkolonneja ja esisekoitusta. Kun vesiliuos on lisätty testijärjestelmään, on suositeltavaa sekoittaa vettä varovasti siten, että sedimenttiä häiritään mahdollisimman vähän.

Kaupallisten valmisteiden käyttö testissä ei ole yleensä suositeltavaa, koska valmisteen ainesosat voivat vaikuttaa testiaineen ja/tai hajoamistuotteiden jakautumiseen vesi- ja sedimenttifaasin välillä. Se voi kuitenkin tulla kysymykseen esimerkiksi veteen heikosti liukenevien testiaineiden kohdalla.

Inkubointisäiliöiden määrä riippuu näytteenottokertojen määrästä (katso kohta 1.9.3). Testissä on oltava riittävästi mitattavia näytteitä, sillä kullakin näytteenottokerralla kuluu kaksi mittausnäytettä. Jos kustakin vesiympäristön sedimenttijärjestelmästä tehdään kontrollinäyte, niitä ei käsitellä testiaineella. Kontrollinäytteitä voidaan käyttää sedimentin mikrobibiomassan sekä veden ja sedimentin orgaanisen hiilen kokonaismäärän määrittämiseen testin lopuksi. Kahta kontrollinäytettä (yksi kontrollinäyte kustakin vesiympäristön sedimentistä) voidaan käyttää akklimatisaatiojakson aikana tarvittavien vesi- ja sedimenttiparametrien tarkkailemiseen (katso taulukko kohdassa 1.8.2.2). Jos testiaine annostellaan liuottimen avulla, tarvitaan lisäksi kaksi kontrollinäytettä, jotta voidaan mitata testijärjestelmän haittavaikutukset mikrobien toimintaan.

([1]) Kahden konsentraation käyttäminen voi olla hyödyllistä testattaessa kemikaaleja, jotka päätyvät pintavesiin eri reittejä ja esiintyvät niissä merkittävästi erilaisina konsentraatioina, kunhan pienempi konsentraatio on analysoitavissa riittävän tarkasti.

▼B

1.9.3 **Testin kesto ja näytteenotto**

Testi saa tavallisesti kestää enintään 100 päivää (6), ja sitä on jatkettava niin kauan, kunnes hajoamisreitit sekä jakautuminen veteen ja sedimenttiin on selvitetty tai 90 % testiaineesta on hävinnyt muuntumisen tai haihtumisen kautta. Näytteenottokertoja on oltava ainakin kuusi (mukaan luettuna näytteenottokerta 0), ja ennen testiä voidaan tehdä vapaaehtoinen esitesti (katso kohta 1.9.4), jonka aikana päätetään asianmukaiset näytteenottojärjestelyt sekä testin kesto, mikäli riittäviä tietoja testiaineesta ei ole saatavissa aikaisemmista tutkimuksista. Kun testataan hydrofobisia aineita, testin alkuvaiheessa saatetaan tarvita ylimääräisiä näytteenottoajankohtia, jotta voidaan määrittää testiaineen jakautumisnopeus vesifaasin ja sedimenttifaasin välillä.

Asianmukaisina näytteenottoaikoina inkubointisäiliöt (rinnakkaisnäytteineen) irrotetaan kokonaisuudessaan analyysia varten. Sedimentti ja sen päällä oleva vesi analysoidaan erikseen ([1]). Pintavesi on poistettava varovasti niin, että sedimenttiä häiritään mahdollisimman vähän. Testiaineen ja hajoamistuotteiden eristämisessä ja karakterisoinnissa on noudatettava asianmukaisia analyysikäytäntöjä. Myös inkubointisäiliöön tai haihtuvien aineiden erottimen putkiin mahdollisesti adsorboitunut materiaali on huolellisesti poistettava.

1.9.4 **Vapaaehtoinen esitesti**

Jos testin kestoa ja näytteenottokäytäntöä ei voida päättää muiden testiainetta koskevien relevanttien tutkimusten perusteella, vapaaehtoinen esitesti voi olla tarpeen. Esitesti on tehtävä samoissa olosuhteissa, joissa varsinainen testi suunnitellaan tehtävän. Jos esitesti tehdään, olennaiset testiolosuhteet ja määritystulokset on lyhyesti raportoitava.

1.9.5 **Mittaukset ja analyysi**

Jokaisella näytteenottokerralla mitataan ja raportoidaan testiaineen ja hajoamistuotteiden konsentraatio vedessä ja sedimentissä (konsentraationa ja prosenttina testiaineen annostellusta määrästä). Yleisesti voidaan todeta, että hajoamistuotteet, jotka havaitaan $\geq$ 10 %:n pitoisuuksina annostellusta radioaktiivisesta aineesta vesi-sedimenttikokonaisjärjestelmässä millä tahansa näytteenottokerralla, on tunnistettava, paitsi mikäli muulle menettelylle on pätevät perusteet. On myös syytä harkita sellaisten hajoamistuotteiden tunnistusta, joiden konsentraatiot kasvavat jatkuvasti testin aikana, vaikka niiden konsentraatiot eivät ylittäisikään edellä esitettyjä rajoja, koska tämä voi merkitä tuotteiden pysyvyyttä. Nämä seikat on harkittava tapauskohtaisesti ja perustelut on esitettävä testiselosteessa.

Määritystulokset kaasujen tai helposti haihtuvien aineiden (CO_2:n ja vastaavien helposti haihtuvien orgaanisten yhdisteiden) erotinjärjestelmistä on raportoitava kullakin näytteenottokerralla. Mineralisaationopeus on myös raportoitava. Uuttumattomat (sitoutuneet) jäämät sedimentissä on raportoitava kullakin näytteenottokerralla.

([1]) Tapauksissa, joissa anaerobiset hajoamistuotteet voivat hapettua uudelleen nopeasti, on huolehdittava anaerobisten olosuhteiden säilymisestä näytteenoton ja analyysin aikana.

▼B

2. **MITTAUSTULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Lisätyn radioaktiivisen aineen kokonaismassatase tai saanto (katso kohta 1.7.1) on laskettava jokaisella näytteenottokerralla. Määritystulokset on raportoitava prosenttina lisätystä radioaktiivisesta aineesta. Radioaktiivisen aineen jakautuminen veden ja sedimentin välille on raportoitava konsentraationa ja prosenttiosuutena jokaisella näytteenottokerralla.

Testiaineen puoliintumisaika, DT_{50}- ja tarvittaessa DT_{75}- ja DT_{90}-arvot on laskettava luottamusväleineen (katso kohta 1.7.3). Tiedot testiaineen häviämisnopeudesta vedessä ja sedimentissä saadaan asianmukaisin arviointimenetelmin. Tällaisia voivat olla näennäisen ensimmäisen asteen kinetiikan käyttö, graafisia tai numeerisia ratkaisuja käyttävät empiiriset käyrän sovitukset sekä monimutkaisemmat arviointimenetelmät, joissa käytetään esimerkiksi yhden tai usean lohkon malleja. Lisätietoja on esitetty lähteissä (35)(36)(37).

Kaikissa lähestymistavoissa on omat vahvuutensa ja heikkoutensa, ja niiden monimutkaisuus vaihtelee suuresti. Ensimmäisen asteen kinetiikka voi yksinkertaistaa hajoamis- ja jakautumisprosesseja liikaa, mutta tapauksissa, joissa sitä voidaan käyttää, sen avulla saadaan suure (nopeusvakio tai puoliintumisaika), joka on helppotajuinen ja käyttökelpoinen simulaatiomallinnuksessa ja ennustettujen ympäristökonsentraatioiden laskennassa. Empiirisillä lähestymistavoilla tai lineaarisilla muunnoksilla voidaan tuottaa paremmin aineistoon sopivia käyriä ja siten tarkempia arvioita puoliintumisajoista, DT_{50}- ja tarvittaessa DT_{75}- ja DT_{90}-arvoista. Derivoitujen vakioiden käyttökelpoisuus on kuitenkin rajoitettua. Lohkomalleilla voidaan luoda riskien arviointia varten useita käyttökelpoisia vakioita, jotka kuvaavat hajoamisnopeutta eri lohkoissa sekä kemikaalin jakautumista. Lohkomalleja on käytettävä myös pääasiallisten hajoamistuotteiden muodostumis- ja hajoamisnopeusvakioiden arviointiin. Valitun menetelmän on kaikissa tapauksissa oltava perusteltu, ja testaajan on esitettävä sovituksen hyvyys graafisesti ja/tai tilastollisesti.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava (josta käy ilmi leiman tai leimojen sijainti käytettäessä radioaktiivista merkkiainetta) ja merkitykselliset fysiko-kemialliset ominaisuudet,

— testiaineen puhtaus (epäpuhtaudet),

— merkkiaineena käytetyn kemikaalin radiokemiallinen puhtaus ja molaarinen aktiivisuus tapauksen mukaan.

▼B

Vertailuaineet:

— hajoamistuotteen karakterisointiin ja/tai tunnistukseen käytettävän vertailuaineen kemiallinen nimi ja rakenne.

Testissä käytettävät sedimentti- ja vesinäytteet:

— vesiympäristöstä otetun sedimentin keräyspaikan tai -paikkojen sijainti ja kuvaus, mukaan luettuna taustatiedot saastumisesta, jos ne ovat saatavissa,

— täydelliset tiedot vesi-sedimenttijärjestelmän keräämisestä, varastoinnista (jos näytettä on varastoitu) sekä akklimatisaatiosta,

— vesi-sedimenttinäytteiden ominaisuudet kohdan 1.8.2.2 taulukon mukaan.

Testiolosuhteet:

— testissä käytetty järjestelmä (esimerkiksi läpivirtaus- tai Erlenmeyer-järjestelmä, ilmastus- ja sekoitustapa, veden tilavuus, sedimentin massa, sekä vesi- että sedimenttikerroksen paksuus ja testisäiliöiden mitat),

— testiaineen annostelu testijärjestelmään: testissä käytetyt konsentraatiot, rinnakkais- ja kontrollinäytteiden määrä, testiaineen annostelutapa (esimerkiksi liuottimen käyttö),

— inkubointilämpötila,

— näytteenottoajat,

— eristysmenetelmät ja -tehokkuudet sekä analyysimenetelmät ja osoitusrajat,

— hajoamistuotteiden karakterisointi- ja tunnistusmenetelmät,

— testin aikana tapahtuneet poikkeamat testiohjeista tai suositelluista olosuhteista.

Tulokset:

— edustavien analyysien mittaustulokset (kaikki mittaustulokset on tallennettava laboratorion arkistoon),

— käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus ja herkkyys,

— saanto (validin testin prosenttiarvot on esitetty kohdassa 1.7.1),

— tulokset taulukkomuodossa, ilmoitetaan testiaineen ja tarvittaessa pääasiallisten hajoamistuotteiden sekä uuttumattomien radioaktiivisten aineiden prosenttiosuutena alkuperäisestä annoksesta ja tarvittaessa mg · kg^{-1} vedessä, sedimentissä ja kokonaisjärjestelmässä (vain prosentteina),

— massatase testien aikana ja niiden lopuksi,

— graafinen esitys testiaineen muuntumisesta vesi- ja sedimenttiosajärjestelmissä sekä kokonaisjärjestelmässä (mineralisaatio mukaan luettuna),

— mineralisaationopeudet,

▼B

— testiaineen ja tarvittaessa pääasiallisten hajoamistuotteiden puoliintumisaika sekä tarvittaessa DT_{50}-, DT_{75}- ja DT_{90}-arvot vedessä, sedimentissä ja kokonaisjärjestelmässä,

— arvio testiaineen ja tarvittaessa pääasiallisten hajoamistuotteiden hajoamiskinetiikasta,

— arvio oletetuista hajoamisreiteistä tapauksen mukaan,

— tulosten pohdinta.

4. **LÄHDELUETTELO**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop ”A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests”, 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation- extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp 1349-1354.

▼B

LIITE 1

AEROBISIIN JA ANAEROBISIIN TESTIJÄRJESTELMIIN LIITTYVIÄ OHJEITA

Aerobinen testijärjestelmä

Tässä menetelmässä kuvattu aerobinen testijärjestelmä koostuu aerobisesta vesikerroksesta (tyypillinen happikonsentraatio on 7-10 mg $\cdot$ l^{-1}) ja sedimenttikerroksesta, joka on aerobinen pinnalta ja anaerobinen sen alta (tyypillinen hapetus-pelkistyspotentiaalien (E_h) keskiarvo sedimentin anaerobisella alueella on - 80 ... - 190 mV). Kussakin inkubointiyksikössä viedään kosteutettua ilmaa veden pinnalle riittävän happimäärän varmistamiseksi ilmatilassa.

Anaerobinen testijärjestelmä

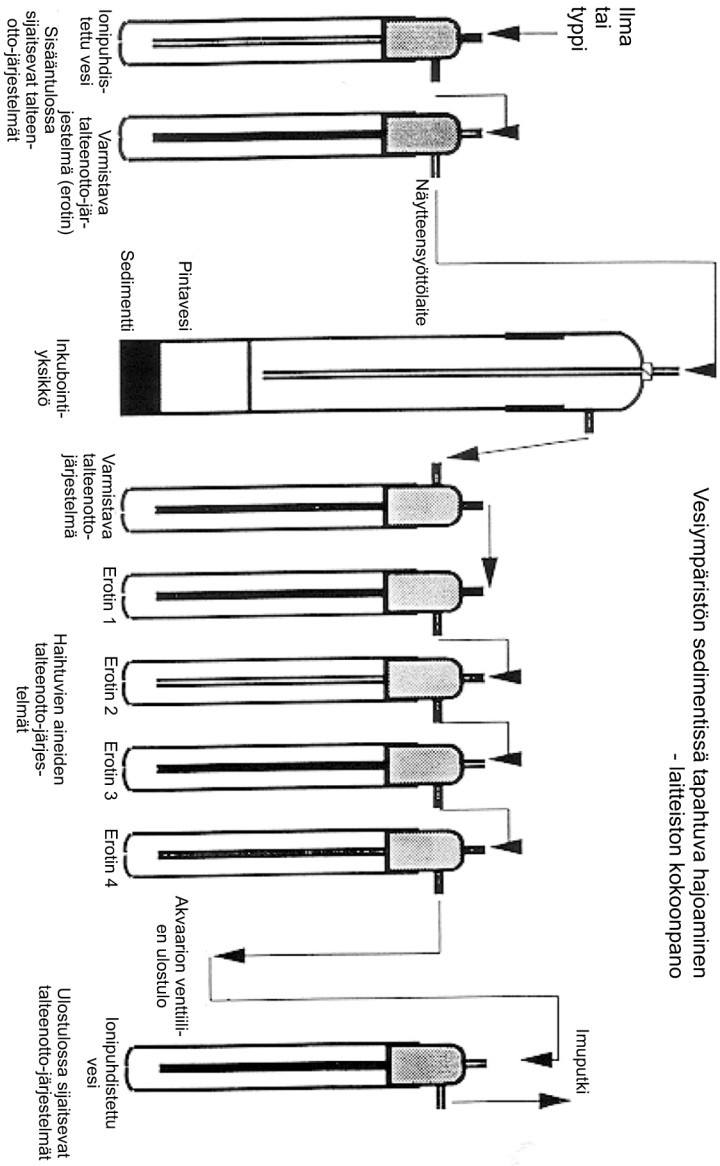
Anaerobisessa testijärjestelmässä testimenettely on olennaisilta osin sama kuin aerobisessa järjestelmässä sillä poikkeuksella, että kussakin inkubointiyksikössä veden pinnalle viedään kosteutettua typpeä riittävän typpimäärän varmistamiseksi ilmatilassa. Sedimenttiä ja vettä voidaan pitää anaerobisina heti, kun hapetus-pelkistyspotentiaali (E_h) on alle - 100 mV.

Anaerobisessa testissä mineralisaation arviointiin kuuluu myös näytteessä kehittyneen hiilidioksidin ja metaanin mittaus.

▼B

LIITE 2

ESIMERKKI LÄPIVIRTAUSJÄRJESTELMÄSTÄ

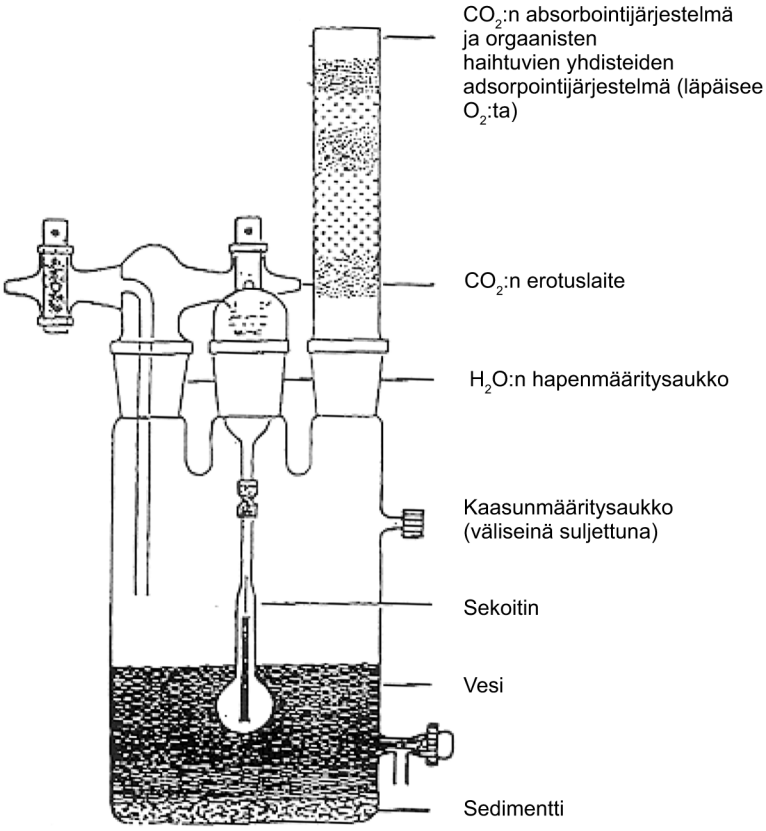


Varmistava talteenottojärjestelmä, tyhjä
Erotin 1:
etyleeniglykoliin otetaan orgaaniset haihtuvat aineet
Erotin 2:
rikkihappoon (0,1 M) otetaan emäksiset haihtuvat aineet
Erottimet 3 & 4:
natriumhydroksidiin (2M) otetaan CO_2 ja muut happamat haihtuvat aineet

▼B

LIITE 3

ESIMERKKI ERLENMEYER-LAITTEESTA (BIOMETER)



▼B

LIITE 4

ESIMERKKILASKELMA TESTIAINEEN ANNOSTELUSTA TESTISÄILIÖIHIN

Lieriön sisähalkaisija:	= 8 cm
Vesipatsaan syvyys sedimentti poisluettuna:	= 12 cm
Pinta-ala: 3,142 $x4^2$	= 50,3 cm^2
Annostus: 500 g testiainetta/ha vastaa 5 $\mu g/cm^2$	
Yhteensä µg: 5 x 50,3	= 251,5 µg
Mukautettu määrä suhteessa 100 cm:n syvyyteen: 12 x 251,5 ÷ 100	= 30,18 µg
Vesipatsaan tilavuus: 50,3 x 12	= 603 ml
Konsentraatio vedessä: 30,18 ÷ 603	= 0,050 µg/ml tai 50 µg/l

▼M1

C.25. AEROBINEN MINERALISAATIO PINTAVEDESSÄ – BIOHAJOAVUUDEN SIMULAATIOTESTI

1 MENETELMÄ

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 309 (2004) (1).

1.1 JOHDANTO

Tämän testin tarkoituksena on mitata aerobisessa luonnonvedessä pienenä pitoisuutena olevan testiaineen biohajoavuus ajan funktiona ja kvantifioida havainnot kineettisten nopeuslausekkeiden muodossa. Tämä simulaatiotesti on laboratoriossa panoskokeena (*batch*) suoritettava ravistelutesti, jossa määritetään luonnon pintavesinäytteissä (makea vesi, murtovesi tai merivesi) olevien orgaanisten aineiden aerobisen biohajoavuuden nopeudet. Se perustuu ISO/DIS 14592–1 -testiin (2) ja sisältää myös osia testimenetelmistä C.23 ja C.24 (3)(4). Jos testi on pitkäkestoinen, panosprosessi voidaan korvata puolijatkuvalla prosessilla, jotta estettäisiin testiorganismin huononeminen. Simulaatiotestin ensijaisena tavoitteena on määrittää testiaineen mineralisaatio pintavedessä, ja mineralisaatio muodostaa perustan hajoamiskinetiikan esittämiselle. Toissijaisesti testissä voidaan tutkia primaarista hajoamista ja merkittävien muuntumistuotteiden muodostumista. Muuntumistuotteiden yksilöinti ja mahdollisuuksien mukaan niiden pitoisuuksien määrittäminen on erityisen tärkeää, kun on kyse hitaasti mineralisoituvista aineista (esim. ^{14}C:n kokonaisjäännöksen puoliintumisaikojen ollessa yli 60 päivää). Analyysitekniikoiden rajoitusten vuoksi merkittävien muuntumistuotteiden yksilöinti ja niiden pitoisuuksien määritys edellyttävät tavallisesti testiaineen käyttöä suurempina pitoisuuksina (esim. > 100 μg/l).

Pieni pitoisuus merkitsee tässä testissä pitoisuutta (esim. alle 1 μg/l – 100 μg/l), joka on tarpeeksi alhainen, jotta testin biohajoavuuskinetiikka vastaa ympäristössä ennakoitavaa biohajoavuuskinetiikkaa. Testissä käytetyssä luonnonvedessä olevien biohajoavien hiilisubstraattien kokonaismassaan verrattuna testiaine, joka on pienenä pitoisuutena, on toissijainen substraatti. Tämä merkitsee, että ennakoitu biohajoavuuskinetiikka on ensimmäistä kertalukua (ei kasvua) ja että testiaine voi hajota metabolisten reaktioiden sivuvaikutuksena (cometabolism). Ensimmäisen kertaluvun kinetiikassa hajoamisnopeus (mg/L/päivä) on suhteessa substraatin pitoisuuteen, joka pienenee ajan myötä. Aidossa ensimmäisen kertaluvun kinetiikassa spesifinen hajoamisen nopeusvakio k ei riipu ajasta eikä pitoisuudesta. Toisin sanoen k:n arvo ei vaihtele merkittävästi kokeen aikana eikä muutu lisättäessä pitoisuutta kokeiden välillä. Spesifinen hajoamisen nopeusvakio vastaa pitoisuuden suhteellista muutosta aikayksikköä kohti: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Vaikka kuvatuissa olosuhteissa ennakoidaan ensimmäisen kertaluokan kinetiikkaa, eräät mahdolliset olosuhteet voivat suosia muuntyyppistä kinetiikkaa. Reaktio voi poiketa ensimmäisen kertaluvun kinetiikasta esimerkiksi siinä tapauksessa, jos aineensiirtoon liittyvät ilmiöt, kuten diffuusionopeus (ei biologisen reaktion nopeus) rajoittaa biotransformaation nopeutta. Data voidaan kuitenkin lähes aina kuvata pseudo-ensimmäisen kertaluvun kinetiikan mukaisesti, jolloin nopeusvakio voi olla pitoisuudesta riippuvainen.

▼M1

Kokeen suunnittelun ja tulosten tulkinnan tueksi pitäisi etukäteen olla käytettävissä (esim. vakioseulontatesteistä saatavia) tietoja testiaineen biohajoavuudesta suuremmilla pitoisuuksilla sekä tietoja abioottisesta hajoavuudesta, muuntumistuotteista ja relevanteista fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista. ^{14}C-leimalla merkittyjen testiaineiden käyttö ja ^{14}C:n faasijakauman määritys testin lopussa mahdollistavat lopullisen biohajoavuuden määrityksen. Käytettäessä leimaamattomia testiaineita lopullinen biohajoavuus voidaan arvioida vain siinä tapauksessa, että testataan suurempi pitoisuus ja että kaikki pääasialliset muuntumistuotteet tunnetaan.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Primaarinen biohajoaminen: Mikro-organismien aiheuttama kemiallisen aineen rakenteellinen muutos (transformaatio), jonka seurauksena aine menettää kemiallisen rakenteensa.

Funktionaalinen biohajoaminen: Mikro-organismien aiheuttama kemiallisen aineen rakenteellinen muutos (transformaatio), jonka seurauksena aine menettää jonkin erityisen ominaisuuden.

Lopullinen (aerobinen) biohajoaminen: Mikro-organismien aiheuttama kemiallisen aineen hajoaminen hapen vaikutuksesta hiilidioksidiksi, vedeksi ja muiden aineiden kivennäissuoloiksi (mineralisaatio) sekä uuden biomassan ja orgaanisten mikrobiologisten biosynteesituotteiden tuottaminen.

Mineralisaatio: Mikro-organismien aiheuttama kemiallisen aineen tai orgaanisen aineen hajoaminen hapen vaikutuksen vuoksi hiilidioksidiksi, vedeksi ja muiden aineiden kivennäissuoloiksi.

Lag-vaihe: Aika testin alusta siihen, kun hajottavien mikro-organismien adaptaatio on tapahtunut ja kemiallisen aineen tai orgaanisen aineen biohajoamisaste on havaittavalla tasolla (esim. 10 % biohajoamisen teoreettisesta enimmäistasosta tai tätä alempi, riippuen mittaustekniikan tarkkuudesta).

Biohajoamisen enimmäistaso: Kemiallisen aineen tai orgaanisen aineen se prosentteina ilmaistu biohajoamistaso testissä, jonka jälkeen biohajoamista ei enää tapahdu testissä.

Ensisijainen substraatti: Kaikki luonnolliset hiilen ja energian lähteet, joiden ansiosta mikrobibiomassa voi kasvaa ja säilyä.

Toissijainen substraatti: Substraatin osa, joka on niin pienenä pitoisuutena, että sen biohajoamisesta vapautuu vain merkityksettömiä määriä hiiltä ja energiaa kompetenteille mikro-organismeille verrattuna hiileen ja energiaan, jotka vapautuvat pääasiallisten substraatin osien (ensisijaisten substraattien) hajoamisesta.

Hajoamisen nopeusvakio: Ensimmäisen kertaluvun tai pseudo-ensimmäisen kertaluvun kinetiikan nopeusvakio k (d^{-1}), joka ilmaisee hajoamisprosessien nopeuden. Panoskokeessa k estimoidaan lag-vaihetta seuraavasta hajoamiskäyrän ensimmäisestä osasta.

▼M1

Puoliintumisaika, $t_{1/2}$ (d): Ensimmäisen kertaluokan reaktion nopeuden kuvaamiseen käytettävä parametri. Se on aikaväli, joka vastaa pitoisuuden vähenemistä puoleen. Puoliintumisajan ja hajoamisen nopeusvakion välinen yhtälö on $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Hajoamisen puoliintumisaika, DT_{50} (d): Biohajoamistestien tuloksen kvantifiointiin käytettävä parametri. Se on aikaväli (mukaan luettuna lag-vaihe), joka tarvitaan 50 prosentin biohajoamisen saavuttamiseen.

Havaitsemisraja (LOD) ja määritysraja (LOQ): Havaitsemisraja (*limit of detection*, LOD) on se aineen pitoisuus, jonka alapuolella ainetta ei voida erottaa määritysartefaktoista. Määritysraja (*limit of quantification*, LOQ) on se aineen pitoisuus, jonka alapuolella pitoisuutta ei voida määritää hyväksyttävällä tarkkuudella.

Liennut orgaaninen hiili (*dissolved organic carbon*, DOC): Se orgaanisen hiilen osa vesinäytteessä, jota ei voida erottaa testiohjeen mukaisella faasierotuksella, esimerkiksi sentrifugioimalla nopeudella 40 000 ms^{-2} 15 minuutin ajan tai kalvosuodatuksella käyttäen kalvoja, joiden huokoskoko on 0,2 μm–0,45 μm.

Orgaanisen ^{14}C:n kokonaisaktiivisuus (*total organic ^{14}C activity*, TOA): Orgaaniseen hiileen liittyvä ^{14}C-kokonaisaktiivisuus.

Liukoisen orgaanisen ^{14}C:n aktiivisuus (*dissolved organic ^{14}C activity*, DOA): Liukoiseen orgaaniseen hiileen liittyvä ^{14}C-kokonaisaktiivisuus.

Partikkelimuodossa olevan orgaanisen ^{14}C:n aktiivisuus (*particulate organic ^{14}C activity*, POA): Partikkelimuodossa olevaan orgaaniseen hiileen liittyvä ^{14}C-kokonaisaktiivisuus.

1.3 TESTIN SOVELLUSALA

Tätä simulaatiotestiä voidaan soveltaa pieninä pitoisuuksina testattaviin haihtumattomiin tai lievästi haihtuviin orgaanisiin aineisiin. Käytettäessä pulloja, joita ei ole suljettu ilmalta (esim. vanutupoilla suljettuja pulloja), käytännössä haihtumattomina voidaan pitää aineita, joiden Henryn lain vakio on alle noin 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (arviolta 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$). Käytettäessä suljettuja pulloja, joissa on vapaa ilmatila, voidaan testata lievästi haihtuvia aineita (joiden Henryn lain vakio on < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ tai < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) ilman vuotoja testijärjestelmästä. ^{14}C-leimattuja aineita voidaan menettää CO_2:n poiston yhteydessä, jos tarvittaviin varokeinoihin ei ryhdytä. Tällaisissa tilanteissa voi olla tarpeen imeyttää CO_2 absorboivaan emäksiseen aineeseen testijärjestelmän sisällä tai käyttää ulkoista CO_2-absorbointijärjestelmää (suora $^{14}CO_2$:n määritys; ks. liite 3). Biohajoavuuskinetiikan määrittämiseksi testiaineen pitoisuuden on oltava sen vesiliukoisuusrajan alapuolella. On huomattava, että lähdekirjallisuudesta saadut vesiliukoisuuden arvot voivat olla merkittävästi suurempia kuin testiaineen liukoisuus luonnonvedessä. Erityisen huonosti veteen liukenevien testiaineiden liukoisuus voidaan määrittää myös käyttämällä testattavaa luonnonvettä.

Menetelmää voidaan käyttää biohajoavuuden simulointiin pintavedesssä, jossa ei ole karkeita hiukkasia (”pelaginen testi”), tai sameassa pintavedessä esimerkiksi lähellä veden ja sedimentin rajapintaa (”suspendoituneen sedimentin testi”).

▼M1

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testi suoritetaan panoskokeena (*batch*) inkuboimalla testiainetta joko pelkästään pintavedellä (pelaginen testi) tai pintavedellä, jossa on suspendoitunutta kiintoainesta tai sedimenttiä kuiva-aineena 0,01–1 g/L (suspendoituneen sedimentin testi). Tällä tavoin testillä simuloidaan vesistöä, jossa on suspendoitunutta kiintoainesta tai uudelleen suspendoitunutta sedimenttiä. Useimmissa pintavesissä suspendoitunut kiintoaines tai sedimetti on tyypillisesti pitoisuuksina, jotka sijoittuvat mainitun asteikon alapäähän. Testipulloja inkuboidaan pimeässä ympäristön lämpötilassa aerobisissa olosuhteissa ja jatkuvasti sekoittaen. Ainakin kahta testiaineen pitoisuutta tulisi käyttää, jotta hajoavuuskinetiikka voidaan määrittää. Pitoisuuksien välillä tulisi olla 5–10-kertainen ero, ja niiden tulisi edustaa pitoisuuksia, joiden odotetaan vallitsevan ympäristössä. Testiaineen enimmäispitoisuus ei saisi olla yli 100 μg/L. Suosituksena on kuitenkin, että se on alle 10 μg/L. Näin varmistetaan, että biohajoavuus noudattaa ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa. Vähimmäispitoisuus ei saisi olla yli 10 μg/L, mutta suosituksena on, että se on 1–2 μg/L tai alle 1 μg/L. Näin pieni pitoisuus mahdollistaa normaalisti riittävän analyysin käytettäessä kaupallisesti saatavilla olevia ^{14}C-leimattuja aineita. Analyysimenetelmien rajoitusten vuoksi testiaineen pitoisuutta on usein mahdoton mitata vaadittavalla tarkkuudella, jos annosteltu testiaineen pitoisuus ≤ 100 μg/L (ks. kohta 1.7.2, toinen kappale). Suurempia testiaineen pitoisuuksia (> 100 μg/L ja joskus > 1 mg/L) voidaan käyttää merkittävien muuntumistuotteiden yksilöintiin ja niiden pitoisuuksien määritykseen tai jos käytettävissä ei ole analyysimenetelmää, jonka havaitsemisraja on tarpeeksi alhainen. Jos testiainetta testataan suurina pitoisuuksina, tuloksia ei ehkä ole mahdollista käyttää ensimmäisen kertaluvun vakion ja puoliintumisajan estimointiin, koska hajoaminen ei todennäköisesti seuraa ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa.

Hajoamista seurataan sopivin aikavälein mittaamalla joko jäännös-^{14}C tai testiaineen jäännöspitoisuus (jos käytetään erityistä kemiallista analyysia). ^{14}C-leima molekyylin stabiileimmassa osassa varmistaa sen, että koko mineralisaatio voidaan määrittää. Jos ^{14}C-leima on vähemmän stabiilissa molekyylin osassa tai jos käytetään erityistä kemiallista analyysia, voidaan arvioida vain primaarinen biohajoaminen. Stabiilein osa ei kuitenkaan välttämättä sisällä molekyylin toiminnan kannalta relevanttia osaa (joka voidaan kytkeä erityiseen ominaisuuteen, kuten toksisuuteen, bioakkumulaatioon jne.). Tällöin voi olla tarkoituksenmukaista käyttää ^{14}C-leimattua testiainetta kyseisessä toiminnan kannalta relevantissa osassa, jos on määrä seurata erityisen ominaisuuden eliminaatiota.

1.5 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Sekä radioaktiivisella merkkiaineella leimattuja että leimaamattomia testiaineita voidaan käyttää tässä testissä. ^{14}C on suositeltava leima, ja sen pitäisi tavallisesti sijaita molekyylin stabiileimmassa osassa tai osissa (ks. myös kohta 1.4). Jos on kyse aineista, joissa on useampi kuin yksi aromaattinen rengas, on suositeltavaa, että yksi tai useampi hiili kussakin renkaassa varustetaan ^{14}C-leimalla. Lisäksi suositellaan, että helposti hajoavien liitosten kummallakin puolella yksi tai useampi hiili varustetaan ^{14}C-leimalla. Testiaineen kemiallisen ja/tai radiokemiallisen puhtauden tulisi olla > 95 %. Kun on kyse radioaktiivisella merkkiaineella merkityistä aineista, suositeltava spesifinen aktiivisuus on noin 50 μCi/mg (1,85 MBq) tai tämän yli, jotta helpotettaisiin ^{14}C-mittauksia pienillä lähtöpitoisuuksilla tehtävissä testeissä. Testiaineesta tulisi olla käytettävissä seuraavat tiedot:

▼**M1**

— vesiliukoisuus [testimenetelmä A.6],

— liukoisuus orgaanisiin liuottimiin (liuottimella käsitellyt aineet tai huonosti veteen liukenevat aineet),

— dissosiaatiovakio (pKa), jos aine protonoituu tai deprotonoituu [OECD TG 112] (5),

— höyrynpaine [testimenetelmä A.4] ja Henryn lain vakio,

— kemiallinen stabiilius vedessä ja pimeässä (hydrolyysi) [testimenetelmä C.7].

Testattaessa huonosti veteen liukenevia aineita merivedessä voi olla hyödyllistä tietää myös ulossuolautumisvakio (Setschenowin vakio) K^s, joka voidaan määrittää seuraavasta lausekkeesta: log (S/S") = K^s C_m, missä S on aineen liukenevuus makeassa vedessä ja S" aineen liukenevuus merivedessä ja C_m molaarinen suolapitoisuus.

Jos testi suoritetaan "suspendoituneen sedimentin testinä", myös seuraavien tietojen tulisi olla käytettävissä:

— n-oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin [testimenetelmä A.8],

— adsorptiokerroin [testimenetelmä C.18].

Myös seuraavat tiedot voivat olla hyödyllisiä:

— ympäristöpitoisuus, jos se tiedetään tai on estimoitu,

— testiaineen toksisuus mikro-organismeille [testimenetelmä C.11],

— nopea biohajoavuus (*ready biodegradability*) ja/tai aineen luontainen biohajoavuus (*inherent biodegradability*) [testimenetelmät C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)],

— aerobinen tai anaerobinen biohajoavuus maassa sekä muuntumistutkimusten tulokset (sedimentti/vesi) [menetelmät C.23, C.24].

1.6 VERTAILUAINE

Vertailuaineena tulisi käyttää ainetta, joka on helposti hajoava aerobisissa olosuhteissa (esim. aniliini tai natriumbentsoaatti). Aniliinin ja natriumbentsoaatin odotettu hajoamisaika on yleensä alle 2 viikkoa. Vertailuaineiden tarkoituksena on varmistaa, että testiveden mikrobiologinen aktiviteetti on tietyissä rajoissa, ts. että vedessä on aktiivinen mikrobipopulaatio.

▼M1

1.7 LAATUKRITEERIT

1.7.1 **Saanto**

Kukin alkuperäinen testipitoisuus tulisi välittömästi testiaineen lisäämisen jälkeen tarkistaa mittaamalla ^{14}C-aktiviteetti tai (jos on kyse testiaineesta, jota ei ole leimattu merkkiaineella) kemiallisella analyysillä vähintään kahdessa näytteessä. Tämä tarjoaa tietoa analyysimenetelmän sovellettavuudesta ja toistettavuudesta ja testiaineen jakauman tasaisuudesta. Tavallisesti myöhemmissä tulosten analyyseissä käytetään alussa mitattua ^{14}C-aktiivisuutta tai testiaineen pitoisuutta eikä nimellispitoisuutta, koska tällä tavoin voidaan ottaa huomioon sorptiosta ja annosteluvirheistä johtuvat häviöt. ^{14}C-leimatun testiaineen osalta saanto testin lopussa ilmoitetaan massataseena (ks. kohta 1.8.9.4, viimeinen kappale). Ihannetapauksessa massataseen tulisi radioaktiivisella merkkiaineella leimattuja aineita käytettäessä olla 90–110 %, ja analyyttisen tarkkuuden tulisi olla sellainen, että merkitsemättömien testiaineiden alkuperäiseksi saannoksi testin alussa saadaan 70–110 %. Näitä vaihteluvälejä tulisi pitää tavoitteina eikä perusteina testin hyväksynnälle. Vaihtoehtoisesti analyyttinen tarkkuus voidaan määrittää testiaineelle alkuperäistä pitoisuutta pienemmällä pitoisuudella sekä merkittäville muuntumistuotteille.

1.7.2 **Analyysimenetelmän toistettavuus ja herkkyys**

Analyysimenetelmän toistettavuus (mukaan luettuna alussa tehtävän uuton tehokkuus) testiaineen ja tapauksen mukaan muuntumistuotteiden kvantifioimiseksi tulisi tarkistaa viidellä rinnakkaisella analyysillä pintaveden yksittäisistä uutteista.

Analyysimenetelmän havaitsemisrajan (LOD) tulisi testiaineen ja muuntumistuotteiden osalta olla mahdollisuuksien mukaan ainakin 1 % testijärjestelmään annostellusta alkuperäisestä määrästä. Määritysrajan (LOQ) tulisi olla 10 % annostellusta pitoisuudesta tai tätä alempi. Monien orgaanisten aineiden ja niiden muuntumistuotteiden kemialliset analyysit edellyttävät usein, että testiaine annostellaan suhteellisen suurina pitoisuuksina (> 100 μg/L).

1.8 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.8.1 **Laitteet**

Testi voidaan tehdä sopivan suuruisissa (esim. 0,5 tai 1,0 litran) erlenmeyerpulloissa tai sylinteripulloissa, jotka on suljettu silikoni- tai kumitulpilla, tai seerumipulloissa, joissa on hiidioksidia läpäisemättömät kannet (esim. butyylikumikalvo). Toisena vaihtoehtona on suorittaa testi useilla pulloilla ja ottaa niiden joukosta kunakin näytteenottoajankohtana näytteeksi vähintään kahden pullon sisältö (ks. kohta 1.8.9.1, viimeinen kappale). Jos testiaineet ovat haihtumattomia eikä niitä ole leimattu radioaktiivisella merkkiaineella, kaasutiiviitä tulppia tai kansia ei vaadita; väljät puuvillatupot, jotka estävät kontaminaation ympäröivästä ilmasta, riittävät (ks. kohta 1.8.9.1, toinen kappale). Lievästi haihtuvat aineet tulisi testata biometer-tyyppisessä järjestelmässä, jossa veden pintaa sekoitetaan kevyesti. Bakteerikontaminaation estämiseksi astiat voidaan vaihtoehtoisesti sterilisoida kuumentamalla tai autoklaavikäsittelyllä ennen käyttöä. Lisäksi käytetään seuraavia tavanomaisia laboratoriolaitteita:

— ravistin tai magneettisekoittimet testipullojen jatkuvaa sekoittamista varten,

▼**M1**

— sentrifugi,

— pH-mittari,

— sameusmittari sameuden nefelometristä määritystä varten,

— uuni tai mikroaaltouuni kuiva-ainemäärityksiä varten,

— kalvosuodatin,

— autoklaavi tai uuni lasiastioiden sterilointia varten,

— laitteet ^{14}C-leimattujen aineiden käsittelyyn,

— laitteet, joilla kvantifioidaan ^{14}C-aktiivisuus CO_2:n imeytysliuoksista otetuissa näytteissä ja tarvittaessa sedimenttinäytteissä,

— analyysilaitteet testiaineen (ja vertailuaineen) määritystä varten, jos käytetään erityistä kemiallista analyysia (esim. kaasukromatografi tai korkean paineen nestekromatografi).

1.8.2 **Testiaineen varastoliuokset**

Testi- ja vertailuaineen varastoliuosten valmistamiseen käytetään deionisoitua vettä (ks. kohta 1.8.7, ensimmäinen kappale). Deionisoidussa vedessä ei saa olla aineita, jotka voivat olla toksisia mikroorganismeille, eikä liukoista orgaanista hiiltä (DOC) yli 1 mg/L (6).

1.8.3 **Pintaveden otto ja kuljetus**

Pintaveden näytteenottopaikka tulisi valita siten, että se vastaa testin tarkoitusta. Näytteenottopaikkojen valinnassa on otettava huomioon mahdollinen maanviljelyn, teollisuuden ja kotitalouksien vaikutus. Jos tiedetään, että vesiympäristö on kontaminoitunut testiaineen tai sitä rakenteeltaan vastaavien aineiden vaikutuksesta edellisten neljän vuoden aikana, sitä ei pitäisi käyttää testiveden ottoon, jollei nimenomaisena tarkoituksena ole tutkia hajoamisnopeuksia jo altistuneissa kohteissa. Veden pH-arvo ja lämpötila tulisi mitata näytteenottopaikassa. Lisäksi tulisi kirjata näytteenottosyvyys ja vesinäytteen ulkonäkö (esim. väri ja sameus). Happipitoisuus ja hapetus-pelkistyspotentiaali (redoxpotentiaali) vedessä ja sedimentin pintakerroksessa mitataan aerobisten ominaisuuksien osoittamiseksi, elleivät ne käy selville vesinäytteen ulkonäöstä ja kohteessa aiemmin saaduista kokemuksista. Pintavesi tulisi kuljettaa täysin puhdistetussa astiassa. Kuljetuksen aikana näytteen lämpötila ei saa merkittävästi ylittää testissä käytettävää lämpötilaa. Viilentäminen 4 °C:seen on suositeltavaa, jos kuljetuksen kesto on yli 2–3 tuntia. Vesinäyte ei saa jäätyä.

▼M1

1.8.4 **Pintaveden säilytys ja valmistelu**

Testi on suositeltavaa aloittaa yhden päivän kuluessa näytteenotosta. Jos vettä joudutaan säilyttämään, säilytysaika on minimoitava, eikä se saa missään tapauksessa ylittää neljää viikkoa. Vesinäytettä olisi pidettävä 4 °C:ssa ilmastettuna sen käyttöön saakka. Karkeat hiukkaset poistetaan ennen käyttöä esimerkiksi suodattamalla nailonsuodattimen (aukkokoko noin 100 μm) tai karkean paperisuodattimen läpi tai sedimentoimalla.

1.8.5 **Sellaisen vesinäytteen valmistelu, johon on lisätty sedimenttiä (vaihtoehtoinen)**

Suspendoituneen sedimentin testissä pintasedimenttiä lisätään luonnonveden (joka on suodatettu karkeiden hiukkasten poistamiseksi kohdassa 1.8.4 kuvatulla tavalla) sisältäviin pulloihin suspension aikaansaamiseksi. Suspendoituneen kiintoaineksen pitoisuuden pitäisi olla 0,01–1 g/L. Pintasedimentin tulisi olla samasta kohteesta, josta vesinäyte otettiin. Kulloisestakin vesiympäristöstä riippuen pintasedimentille voi olla ominaista joko suuri orgaanisen hiilen määrä (2,5–7,5 %) ja hienojakoisuus tai matala orgaanisen hiilen määrä (0,5–2,5 %) ja karkeajakoisuus (3). Pintasedimentti voidaan valmistaa seuraavasti: sedimentistä otetaan useita kairausnäytteitä käyttäen läpinäkyvää muoviputkea, ja ylemmät aerobiset kerrokset (pinnasta enintään 5 mm:n syvyyteen) leikataan pois välittömästi näytteenoton jälkeen ja yhdistetään. Näin saatava sedimenttinäyte kuljetetaan säiliössä, jossa on laaja vapaa ilmatila, jotta sedimentti pysyisi aerobisissa olosuhteissa (näyte on viilennettävä 4 °C:seen, jos kuljetus kestää yli 2–3 tuntia). Sedimenttinäyte suspendoidaan testiveteen suhteessa 1:10 ja pidetään 4 °C:ssa ilmastettuna aina käyttöön saakka. Jos sedimenttiä joudutaan säilyttämään, säilytysaika on minimoitava, eikä se saa missään tapauksessa ylittää neljää viikkoa.

1.8.6 **Puolijatkuva menettely (vaihtoehtoinen)**

Pitkä inkuboimisaika (useita kuukausia) voi olla tarpeen, jos lagvaihe kestää pitkään ennen kuin merkittävää testiaineen hajoamista voidaan mitata. Jos tämä tiedetään jo aikaisempien testien perusteella, testissä voidaan alusta lähtien käyttää puolijatkuvaa menettelyä, jossa osa testivedestä tai suspensiosta korvataan määräajoin uudella vedellä. Vaihtoehtoisesti normaali panoskoe (*batch*) voidaan muuttaa testin aikana puolijatkuvaksi testiksi, jos testiaineen hajoamista ei ole tapahtunut noin 60 päivän kuluessa panostestimenettelyä käyttäen (ks. kohta 1.8.8.3, toinen kappale).

1.8.7 **Testiaineen (tai vertailuaineen) lisääminen**

Jos aineen vesiliukoisuus on suuri (> 1 mg/L) ja haihtuvuus pieni (Henryn lain vakio < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ tai < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), varastoliuos voidaan valmistaa deionisoituun veteen (ks. kohta 1.8.2), minkä jälkeen sopiva määrä varastoliuosta lisätään testiastioihin, kunnes haluttu pitoisuus on saavutettu. Lisätyn varastoliuoksen määrä tulisi pitää mahdollisimman pienenä (mahdollisuuksien mukaan < 10 % lopullisesta nestevolyymista). Toisena mahdollisuutena on liuottaa testiaine suurempana volyyminä testiveteen; tätä voidaan pitää vaihtoehtona orgaanisten liuottimien käytölle.

▼M1

Jos muuta mahdollisuutta ei ole, haihtumattomien ja heikosti veteen liukenevien aineiden varastoliuokset tulisi valmistaa käyttämällä haihtuvaa orgaanista liuotinta, mutta testijärjestelmään lisätyn liuottimen määrä ei saisi ylittää 1 % (v/v) eikä vaikuttaa haitallisesti mikrobiologiseen aktiivisuuteen. Liuotin ei saa vaikuttaa testiaineen stabiiliuteen vedessä. Liuotin tulisi poistaa, kunnes sitä on jäljellä äärimmäisen pieni määrä, jottei se lisäisi merkittävästi testiveden tai suspension DOC-pitoisuutta. Tämä tulisi tarkistaa ainekohtaisella analyysillä tai DOC-analyysilla, jos se on mahdollista (6). Huolehdittaessa siitä, että lisätyn liuottimen määrä rajoitetaan välttämättömään, on samalla varmistettava, että testiainemäärä voi liueta lopullisessa testiveden määrässä. Myös muita tapoja annostella testiaine testiastioihin voidaan käyttää (ks. (7) ja (8)). Jos testiaineen annostelussa käytetään orgaanista liuotinta, liuotinkontrolleja, jotka sisältävät pelkästään testivettä (ilman lisättyjä aineita) sekä testivettä, johon on lisätty vertailuaine, on käsiteltävä samalla tavoin kuin aktiivisia testiastioita, joissa on testiaine kantoaineenaan liuotin. Liuotinkontrollien tarkoituksena on tutkia liuottimen mikrobipopulaatiolle mahdollisesti aiheuttamia haitallisia vaikutuksia vertailuaineen hajoamisen perusteella.

1.8.8 **Testiolosuhteet**

1.8.8.1 *Testilämpötila*

Inkubaation tulisi tapahtua pimeässä (suositeltava vaihtoehto) tai heikossa valossa säädellyssä (± 2 °C) lämpötilassa, joka voi olla ympäristön lämpötila tai 20–25 °C:n vakiolämpötila. Ympäristön lämpötila voi olla joko näytteen oma lämpötila näytteenottoajankohtana tai ympäristön keskilämpötila näytteenottopaikassa.

1.8.8.2 *Sekoittaminen*

Testipulloja sekoitetaan ravistelemalla tai hämmentämällä niitä jatkuvasti, jotta hiukkaset ja mikro-organismit pysyisivät suspendoituneina. Sekoittaminen myös auttaa hapen siirtymistä avoimesta ilmatilasta nesteeseen, niin että voidaan ylläpitää riittäviä aerobisia olosuhteita. Testipullot asetetaan ravistimeen (noin 100 rpm), tai niitä sekoitetaan magneettisekoittimella. Sekoittamisen on oltava jatkuvaa. Ravistelun tai hämmentämisen on kuitenkin oltava mahdollisimman varovaista siten, että suspensio juuri ja juuri pysyy homogeenisena.

1.8.8.3 *Testin kesto*

Testi ei saisi tavallisesti kestää yli 60 päivää, jollei käytetä puolijatkuvaa prosessia, jossa testisuspensiota korvataan määrävälein uudella (ks. kohta 1.8.6 ja liite 2). Testin kesto panoskokeessa voidaan kuitenkin pidentää enimmillään 90 päivään, jos testiaineen hajoaminen on alkanut ensimmäisten 60 päivän aikana. Hajoamista seurataan sopivin aikavälein määrittämällä ^{14}C-jäännösaktiivisuus tai muodostunut $^{14}CO_2$ (ks. kohta 1.8.9.4) ja/tai kemiallisella analyysilla (kohta 1.8.9.5). Inkubaatioajan on oltava riittävän pitkä, jotta hajoamisprosessi voidaan arvioida. On suositeltavaa, että hajoamisen laajuus on yli 50 %. Hitaasti hajoavien aineiden osalta hajoamisen laajuuden on oltava riittävä (tavallisesti yli 20 %), jotta hajoamiskinetiikan nopeusvakio voidaan estimoida.

▼M1

Happipitoisuus ja pH on mitattava testijärjestelmässä määrävälein, jolleivät nämä mittaukset ole tarpeettomia samasta kohteesta otetuilla vesi- ja sedimenttinäytteillä tehdyistä vastaavista testeistä saadun kokemuksen perusteella. Vedessä tai sedimentissä paljon suurempina pitoisuuksina olevien ensisijaisten substraattien metabolismi saattaa joissain olosuhteissa johtaa CO_2:n muodostumiseen ja hapen häviämiseen siinä määrin, että se muuttaa merkittävästi koeolosuhteita testin aikana.

1.8.9 **Menettely**

1.8.9.1 *Testipullojen valmistelu pelagiseen testiin*

Sopiva määrä testivettä siirretään testipulloihin, enintään noin kolmasosa pullon volyymistä ja vähintään noin 100 ml. Jos käytetään useita pulloja (joiden joukosta otetaan näytteeksi kokonaisten pullojen sisältö kunakin näytteenottoajankohtana), sopiva testiveden määrä on niin ikään noin 100 ml, koska pienet näytemäärät voivat vaikuttaa lag-vaiheen pituuteen. Testiaine lisätään varastoliuoksesta kohdissa 1.8.2 ja 1.8.7 kuvatulla tavalla. Ainakin kahta eri testiaineen pitoisuutta, jotka poikkeavat toisistaan 5–10-kertaisesti, tulisi käyttää hajoamiskinetiikan määrittämiseksi ja sen nopeusvakion laskemiseksi. Kummakin valitun pitoisuuden pitäisi olla alle 100 μg/L ja mieluiten välillä < 1–10 μg/L.

Testipullot suljetaan ilma- ja CO_2-tiiviillä tulpilla tai kansilla. Haihtumattomille testikemikaaleille, joita ei ole merkitty ^{14}C-leimalla, soveltuvat väljät vanutupot, jotka estävät kontaminaation ilmasta (ks. kohta 1.8.1). Edellytyksenä on kuitenkin, että mahdollisten merkittävien hajoamistuotteiden tiedetään olevan hajoamattomia ja että käytetään epäsuoraa CO_2-pitoisuuden määritystä (ks. liite 3).

Testipulloja inkuboidaan valitussa lämpötilassa (ks. kohta 1.8.8.1). Testin alussa (ennen biohajoamisen alkamista, ks. kohta 1.7.1) otetaan näytteitä kemiallista analyysia tai ^{14}C-mittauksia varten ja sen jälkeen sopivin välein testin aikana. Näytteenotto voidaan suorittaa ottamalla osanäyte (esim. 5 ml) kustakin rinnakkaisesta näytteestä tai ottamalla näytteeksi kokonaisia testipulloja kunakin näytteenottoajankohtana. Testiaineen mineralisaatio voidaan määrittää joko epäsuorana tai suorana määrityksenä (ks. liite 3). Hajoamisvaiheen aikana (eli lag-vaiheen päätyttyä) tarvitaan tavallisesti vähintään viisi näytteenottoa, jotta nopeusvakio voidaan estimoida luotettavasti, jollei voida perustella, että kolme näytteenottoa riittää nopeasti hajoaville aineille. Jos aine ei ole nopeasti hajoava, hajoamisvaiheen aikana voidaan helposti tehdä lisää mittauksia, jolloin k:n estimointiin käytetään enemmän datapisteitä. Näytteenottoa varten ei voida vahvistaa aikaväliä, koska biohajoamisen nopeus vaihtelee. Suosituksena on kuitenkin, että näyte otetaan kerran viikossa, jos hajoaminen on hidasta. Jos testiaine on nopeasti hajoava, näytteenoton tulisi tapahtua kerran päivässä ensimmäisten kolmen päivän aikana ja sen jälkeen joka toinen tai kolmas päivä. Joissain olosuhteissa, esimerkiksi hyvin nopeasti hydrolisoituvien aineiden tapauksessa, voi olla tarpeen ottaa näytteet tunnin välein. Ennen testiä on suositeltavaa tehdä esitutkimus sopivan näytteenottovälin määrittämiseksi. Jos käytettävissä on oltava näytteitä myöhempiä erityisiä analyyseja varten, näytteitä otetaan enemmän ja analysoitavat näytteet valitaan kokeen lopussa vastakkaisessa järjestyksessä siten, että viimeiset näytteet analysoidaan ensin (näytteiden stabiiliudesta varastoinnin aikana ks. kohta 1.8.9.5, toinen kappale).

▼**M1**

1.8.9.2 *Testipullojen ja näytteiden lukumäärä*

Testipulloja tarvitaan seuraavasti:

— testipullot: ainakin kaksi testipulloa kutakin testiaineen pitoisuutta varten (suositeltava määrä on vähintään kolme) tai useampia testipulloja kutakin pitoisuutta kohti, jos kunakin näytteenottoajankohtana otetaan otetaan näytteeksi kokonaisia pulloja (lyhenne F_T),

— testipullot massataseen laskemista varten: ainakin kaksi testipulloa kutakin pitoisuutta kohti (lyhenne F_M),

— nollanäyte ilman testiainetta: ainakin yksi taustanäytepullo, joka sisältää pelkästään testivettä (lyhenne F_B),

— vertailukontrolli: kaksi testipulloa, joissa on vertailuaine (esim. aniliini tai natriumbentsoaattia 10 µg/l) (lyhenne F_C). Vertailukontrollin tarkoituksena on vahvistaa tietyn mikrobiologisen aktiviteetin olemassaolo. Radioaktiivista vertailuainetta voidaan käyttää, jos se on käytännöllistä, myös siinä tapauksessa, että testiaineen hajoamista seurataan kemiallisella analyysilla,

— steriili kontrolli: yksi tai kaksi testipulloa, jotka sisältävät steriloitua testivettä, jotta voidaan tutkia mahdollista abioottista hajoamista tai muuta testiaineen ei-biologista häviämistä (lyhenne F_S). Biologinen aktiivisuus voidaan lopettaa testiveden autoklaavikäsittelyllä (20 min 121 °C:ssa) tai lisäämällä myrkyllistä ainetta (esim. natriumatsidia (NaN_3) 10–20 g/l, elohopeakloridia ($HgCl_2$) 100 mg/l tai formaliinia 100 mg/l) tai gammasäteilytyksellä. Käytettäessä $HgCl_2$:a siitä tulisi huolehtia myrkyllisenä jätteenä. Steriilien olosuhteiden luominen veteen ei ole helppoa, jos se sisältää sedimenttiä suurina määrinä. Tässä tapauksessa suositellaan autoklaavikäsittelyn toistamista (esim. suorittamalla se kolmesti). Tällöin tulisi ottaa huomioon, että sedimentin sorptio-ominaisuudet voivat muuttua autoklaavikäsittelyn vuoksi,

— liuotinkontrollit, jotka sisältävät pelkästään testivettä sekä testivettä, johon on lisätty vertailuaine; kutakin kontrollia kohti kaksi testipulloa, jotka sisältävät saman määrän liuotinta ja joita käsitellään samalla tavoin kuin testiaineen annostelemisessa. Tarkoituksena on tutkia mahdollisia liuoksen haitallisia vaikutuksia määrittämällä vertailuaineen hajoaminen.

Testiä suunniteltaessa tulisi ottaa huomioon, miten testien määrän lisääminen vaikuttaa näytteenottoajankohtien määrään. Tarvittavien testipullojen tarkka määrä riippuu hajoamisen laskentaan käytetystä menetelmästä (ks. kohta 1.8.9.1, kolmas kappale; kohta 1.8.9.4 ja liite 3).

▼**M1**

Kustakin testipullosta tulisi ottaa kaksi osanäytettä (esim. 5 ml) kunakin näytteenottoajankohtana. Jos käytetään useampia pulloja, joiden joukosta otetaan näytteet kokonaisten pullojen sisältöinä, vähintään kahden testipullon sisältö tulisi ottaa näytteeksi kunakin näytteenottoajankohtana (ks. kohta 1.8.9.1, ensimmäinen kappale).

1.8.9.3 *Testipullojen valmistelu suspendoituneen sedimentin testiä varten [vaihtoehtoinen]*

Tarvittavat määrät testivettä ja (tarvittaessa) sedimenttiä lisätään testipulloihin (ks. kohta 1.8.5). Testipullot valmistellaan suspendoituneen sedimentin testiä varten samalla tavoin kuin pelagista testiä varten (ks. kohdat 1.8.9.1 ja 1.8.9.2). Suosituksena on käyttää seerumipulloja tai niiden muotoisia testipulloja. Suljetut testipullot asetetaan ravistimeen vaaka-asentoon. ^{14}C-leimalla varustamattomia haihtumattomia aineita sisältävät avoimet testipullot asetetaan pystyasentoon. Tässä tapauksessa suositellaan sekoitusta magneettisekoittimella, jossa käytetään lasipinnoitteisia magneettisauvoja. Tarvittaessa testipulloja on ilmastettava aerobisten olosuhteiden ylläpitämiseksi.

1.8.9.4 *Radiokemialliset määritykset*

Muodostunut $^{14}CO_2$ mitataan epäsuorana ja suorana määrityksenä (ks. liite 3). $^{14}CO_2$:n epäsuora määritys tapahtuu määrittämällä testissä käytetyn veden tai suspension alkuperäisen ^{14}C-aktiivisuuden ja näytteenottoajankohtana mitatun jäännösaktiivisuuden kokonaismäärän välinen erotus sen jälkeen, kun näyte on happamoitettu pH-arvoon 2–3 ja CO_2 poistettu. Koska epäorgaaninen hiili poistetaan, mitattu jäännösaktiivisuus on peräisin orgaanisesta materiaalista. Epäsuoraa $^{14}CO_2$:n määritystä ei tulisi käyttää, jos testiaineen muuntumisen aikana muodostuu merkittäviä haihtuvia muuntumistuotteita (ks. liite 3). $^{14}CO_2$:n muodostuminen tulisi mahdollisuuksien mukaan mitata suorana määrityksenä (ks. liite 3) kunakin näytteenottoajankohtana vähintään yhdessä testipullossa. Tällä menettelyllä voidaan tarkistaa sekä massatase että biohajoamisprosessi, mutta sitä voidaan käyttää vain suljetuilla testipulloilla tehtävissä testeissä.

Jo muodostunut $^{14}CO_2$ mitataan suorana määrityksenä testin aikana, tätä varten tulisi varata enemmän testipulloja testin alussa. Suoraa $^{14}CO_2$:n määritystä suositellaan, jos testiaineen muuntumisen aikana muodostuu merkittäviä haihtuvia muuntumistuotteita. Lisätestipullot happamoitetaan kunakin näytteenottoajankohtana pH-arvoon 2–3 ja $^{14}CO_2$ erotetaan sisäiseen tai ulkoiseen imeyttimeen (ks. liite 3).

^{14}C-leimatun testiaineen ja merkittävien muuntumistuotteiden pitoisuudet voidaan vaitoehtoisesti määrittää käyttämällä radiokromatografiaa (esim. RAD-TLC-ohutkerroskromatografiaa) tai HPLC:tä radiokemiallisella detektiolla.

Vaihtoehtoisesti voidaan määrittää jäljellä olevan radioaktiivisuuden faasijakauma (ks. liite 1) ja jäljellä oleva testiaine ja muuntumistuotteet.

▼M1

Testin lopussa massatase tulisi määrittää suoralla $^{14}CO_2$:n mittauksella käyttäen erillisiä testipulloja, joista ei ole otettu näytteitä testin aikana (ks. liite 3).

1.8.9.5 *Erityinen kemiallinen analyysi*

Jos käytettävissä on herkkä erityinen analyysimenetelmä, primaarinen biohajoaminen voidaan arvioida mittaamalla testiaineen kokonaisjäännöspitoisuus sen sijaan, että käytettäisiin radioaktiivisia merkkiaineita. Käytettäessä radioaktiivisella merkkiaineella leimattua testiainetta (kokonaismineralisaation mittaamiseksi) erityisiä kemiallisia analyyseja voidaan tehdä samanaikaisesti, sillä niiden avulla voidaan saada hyödyllisiä lisätietoja ja arvioida menettelyä. Erityistä kemiallista analyysia voidaan myös käyttää testiaineen hajoamisen aikana syntyneiden muuntumistuotteiden mittaamiseksi, ja tätä suositellaan aineille, joiden mineraalisaatio tapahtuu yli 60 päivän puoliintumisajoin. Testiaineen pitoisuus ja muuntumistuotteet kunakin näytteenottoajankohtana tulisi mitata ja kirjata testiselosteeseen (pitoisuutena ja prosenttiosuutena). Yleisesti muuntumistuotteet, joiden prosenttiosuuden todetaan olevan ≥ 10 % annostellusta pitoisuudesta minä tahansa näytteenottoajankohtana, olisi yksilöitävä, ellei ole perusteltua jättää tätä tekemättä. Lisäksi on harkittava sellaisten muuntumistuotteiden yksilöimistä, joiden pitoisuudet kasvavat jatkuvasti testin aikana, vaikka niiden pitoisuudet eivät ylittäisi edellä mainittua rajaa, sillä pitoisuuden jatkuva kasvu voi olla merkkinä pysyvyydestä. Muuntumistuotteiden analyysia steriileissä kontrolleissa olisi harkittava, jos testiaineen nopean abioottisen muuntumisen (esim. hydrolyysin) katsotaan olevan mahdollista. Muuntumistuotteiden kvantifioinnin ja yksilöinnin tarvetta tulisi harkita tapauskohtaisesti, ja se tulisi perustella testiselosteessa. Uuttomenetelmiä, joissa käytetään orgaanista liuotinta, tulisi soveltaa kyseistä analyysimenetelmää varten annettuja ohjeita noudattaen.

Kaikki näytteet varastoidaan ilmatiiviisti 2–4 °C:n lämpötilassa, jos analyysi tehdään 24 tunnin sisällä (suositeltava vaihtoehto). Tätä pitempää säilytystä varten näytteet olisi jäädytettävä alle –18 °C:seen tai säilöttävä kemiallisesti. Happamoittaminen ei ole suositeltava keino näytteiden säilömiseksi, koska happamoitetut näytteet voivat olla epästabiileja. Jos näytteitä ei analysoida 24 tunnin kuluessa ja niitä säilytetään pitempään, olisi tehtävä tutkimus niiden stabiiliudesta varastoinnin aikana, jotta voidaan osoittaa kyseisten kemikaalien stabiilius alle –18 °C:n lämpötilassa tai säilöntäoloissa. Jos analyysimenetelmä edellyttää joko liuotinuuttoa tai kiinteäfaasiuuttoa (SPE), uutto tulisi tehdä välittömästi näytteenoton jälkeen tai enintään 24 tunnin kylmävarastoinnin jälkeen.

Analyysimenetelmän herkkyydestä riippuen voidaan tarvita suurempia näytemääriä kuin 1.8.1 kohdassa mainitaan. Testi voidaan helposti suorittaa yhden litran testivolyymeilla 2–3 litran testipulloissa, jolloin voidaan ottaa noin 100 ml:n suuruisia näytteitä.

▼M1

2. **TULOKSET JA TESTISELOSTE**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

2.1.1 **Tulosten graafinen esitys**

Näytteenottoajat pyöristetään tuntien kokonaisluvuksi (jollei aine hajoa merkittävästi minuuteissa tai muutamassa tunnissa), mutta ei päivien kokonaisluvuksi. Testiaineen jäännösaktiivisuuden (^{14}C-leimattujen aineiden osalta) tai jäännöspitoisuuden (leimaamattomien aineiden osalta) estimaatit esitetään graafisesti ajan funktiona sekä lineaarisena että puolilogaritmisena käyränä (ks. kuvat 1a ja 1b). Jos hajoamista on tapahtunut, testipulloista F_T saatuja tuloksia verrataan testipulloista F_S saatuihin tuloksiin. Jos testiaineen sisältävistä testipulloista (F_T) ja steriileistä testipulloista (F_S) saatujen tulosten keskiarvot poikkeavat alle 10 %, voidaan olettaa, että todettu hajoaminen on pääasiassa abioottista. Jos hajoaminen testipulloissa F_S on vähäisempää, tuloksia voidaan käyttää testipulloilla F_T saatujen tulosten korjaamiseen (vähennys) biohajoamisen laajuuden estimoimiseksi. Jos merkittävistä muuntumistuotteista tehdään (vaihtoehtoisia) lisäanalyyseja, niiden muodostumista ja hajoamista koskevat käyrät tulisi esittää testiaineen hajoamiskäyrän lisäksi.

Lag-vaiheen kesto t_L estimoidaan hajoamiskäyrästä (puolilogaritmisesta käyrästä) ekstrapoloimalla sen lineaarinen osa tasolle, jolla hajoaminen on nolla, tai vaihtoehtoisesti määrittämällä aika noin 10 prosentin hajoamiselle (ks. kuvat 1a ja 1b). Puolilogaritmisesta käyrästä estimoidaan ensimmäisen kertaluvun nopeusvakio k ja sen keskivirhe lineaarisella regressiolla kuvaajasta ln (^{14}C-jäännösaktiivisuus tai testiaineen pitoisuus) vs. aika. Erityisesti ^{14}C-mittausten osalta käytetään ainoastaan käyrän ensimmäiseen lineaariseen osaan liittyviä tuloksia, ja tällöin mieluummin pientä määrää tarkkoja tuloksia kuin suurempaa määrää epätarkempia tuloksia. Epätarkkuudella tarkoitetaan tässä muun muassa suositeltuun ^{14}C-jäännösaktiivisuuden suoraan määritykseen liittyviä ominaisvirheitä (ks. jäljempänä). Joskus voi olla tarkoituksenmukaista laskea kaksi eri nopeusvakiota, jos hajoaminen tapahtuu kahdessa vaiheessa. Tätä varten määritellään kaksi eri vaihetta hajoamiskäyrässä. Nopeusvakio (k) ja puoliintumisaika ($t_{½}$ = ln2/k) tulisi laskea kullekin rinnakkaiselle näytteelle siinä tapauksessa, että niistä otetaan osanäytteitä; keskiarvoja voidaan käyttää siinä tapauksessa, että näytteeksi otetaan kokonaisia testipulloja kunakin näytteenottoajankohtana (ks. kohta 1.8.9.2, viimeinen kappale). Käytettäessä ensin mainittua menettelyä nopeusvakio ja puoliintumisaika olisi ilmoitettava kullekin yksittäiselle rinnakkaiselle näytteelle sekä lisäksi keskiarvona keskivirheineen. Jos testiainetta on käytetty suurina pitoisuuksina, hajoamiskäyrä voi poiketa merkittävästi suorasta viivasta (puolilogaritminen kuvio) ja reaktio ei ehkä edusta ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa. Puoliintumisajan määrittäminen ei tällöin ole mielekästä. Rajoitettuun tulosjoukkoon voidaan kuitenkin soveltaa pseudo-ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa ja estimoida hajoamisen puoliintumisaika DT_{50} (aika, jossa saavutetaan 50 % hajoamisesta). On kuitenkin muistettava, että valitun tulosjoukon ulkopuolella hajoamisaikaa ei voida ennustaa käyttäen DT_{50}:a, joka on vain tietyn tulosjoukon kuvaaja. Tilastolaskelmia ja käyrän sovitusta helpottavia analyysivälineitä on helposti saatavilla, ja tällaisten ohjelmistojen käyttö on suositeltavaa.

▼M1

Jos käytetään erityistä kemiallista analyysia, primaarisen hajoamisen nopeusvakiot ja puoliintumisajat estimoidaan edellä kuvatulla tavalla kokonaismineralisaatiolle. Jos primaarinen hajoaminen rajoittaa reaktion nopeutta, voidaan käyttää datapisteitä koko hajoamisajalta. (^{14}C-aktiivisuuden mittauksista poiketen kyseiset mittaukset tehdään suorina määrityksinä.)

Jos käytetään ^{14}C-leimattuja aineita, massatase tulisi ilmaista prosenttiosuutena annostellusta alkuperäisestä pitoisuudesta ainakin testin lopussa.

2.1.2 **Jäännösaktiivisuus**

Kun orgaanisen aineen ^{14}C-leimattu osa biohajoaa, suurin osa ^{14}C:stä muuttuu $^{14}CO_2$:ksi ja osa käytetään biomassan kasvuun ja/tai solunulkoisten metaboliittien synteesiin. Aineen täydestä eli ”lopullisesta” biohajoamisesta ei sen vuoksi ole tuloksena, että sen sisältämä hiili muuttuu 100-prosenttisesti $^{14}CO_2$:ksi. Biosynteesin kautta muodostuneisissa tuotteissa oleva ^{14}C vapautuu myöhemmin hitaasti $^{14}CO_2$:na ”sekundaarisen mineralisaation” vuoksi. Näistä syistä orgaanisen ^{14}C-jäännösaktiivisuuden (joka on mitattu CO_2:n poiston jälkeen) tai muodostuneen $^{14}CO_2$:n käyrät ajan funktiona ulottuvat hajoamisen päättymisajankohdan yli (”*tailing*”). Tämä monimutkaistaa tulosten kineettistä tulkintaa, minkä vuoksi vain käyrän ensimmäistä osaa (joka alkaa lag-vaiheen päättymisestä ja päättyy ennen 50 prosentin hajoamisen saavuttamista) tulisi normaalisti käyttää hajoamisen nopeusvakion estimoinnissa. Jos testiainetta on hajonnut, orgaanisen ^{14}C:n jäännösaktiivisuus on aina suurempi kuin jäljellä olevan vielä hajoamattoman testiaineen ^{14}C-aktiivisuus. Jos testiaineen hajoamisreaktio on ensimmäistä kertalukua ja konstantti fraktio α mineralisoituu CO_2:ksi, ^{14}C:n häviämiskäyrän (orgaanisen ^{14}C:n kokonaismäärä vs. aika) alkukaltevuus on α kertaa testiaineen (tai tarkemmin sanoen testiaineen ^{14}C-leimalla merkityn osan) pitoisuutta kuvaavan vastaavan käyrän kaltevuus. Orgaanisen ^{14}C:n kokonaisaktiivisuuden korjaamattomien mittausten perusteella laskettuun hajoamisen nopeusvakioon liittyy virhemarginaali. Kirjallisuudessa kuvataan menetelmiä estimoida testiaineen pitoisuudet mitatuista radiokemiallisista aktiivisuuksista erilaisten yksinkertaistusoletusten perusteella (2)(9)(10)(11). Näitä menetelmiä voidaan parhaiten soveltaa nopeasti hajoaviin aineisiin.

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Jos todetaan, että k ei riipu pitoisuuden lisäämisestä (toisin sanoen jos laskettu k:n arvo on suunnilleen sama testiaineen eri pitoisuuksilla), ensimmäisen kertaluvun nopeusvakion voidaan olettaa edustavan käytettyjä testiolosuhteita (testiaine, vesinäyte ja testilämpötila). Se, missä määrin tulokset voidaan yleistää tai ekstrapoloida muita järjestelmiä koskeviksi, on määritettävä asiantuntijaarviona. Jos testiainetta käytetään suurena pitoisuutena ja hajoaminen ei siksi noudata ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa, tuloksia ei voida käyttää ensimmäisen kertaluvun nopeusvakion tai vastaavan puoliintumisajan suoraan estimointiin. Tällaisesta testistä, jossa testiainetta käytetään suurena pitoisuutena, saatuja tuloksia voidaan ehkä silti kuitenkin käyttää mineralisaation kokonaisasteen estimointiin ja/tai muuntumistuotteiden havaitsemiseen ja kvantifiointiin.

▼M1

Jos muiden häviämisprosessien kuin biohajoamisen (esim. hydrolyysin tai haihtumisen) nopeudet tunnetaan, ne voidaan vähentää testin aikana todetusta nettohäviämisnopeudesta, jolloin saadaan summittainen estimaatti biohajoamisnopeudelle. Hydrolyysiä koskeva data voidaan saada esimerkiksi steriilistä kontrollista tai rinnakkaisesta testistä, jossa käytetään suurempaa testiaineen pitoisuutta.

$^{14}CO_2$:n epäsuoraa ja suoraa määritystä (ks. kohta 1.8.9.4 ja liite 3) voidaan käyttää vain mitattaessa sitä, missä määrin testiaine mineralisoituu CO_2:ksi. Radiokromatografiaa (RAD-TLC) tai HPLC:tä voidaan käyttää analysoitaessa ^{14}C-leimatun testiaineen pitoisuuksia ja merkittävien muuntumistuotteiden muodostumista (ks. kohta 1.8.9.4, kolmas kappale). Puoliintumisajan suoran estimoinnin ehtona on, ettei merkittäviä muuntumistuotteita ole (muuntumistuote on merkittävä, jos se on ≥ 10 % testiaineen annostellusta määrästä). Jos merkittäviä muuntumistuotteita on, on tehtävä yksityiskohtainen arviointi tuloksista. Tähän voi sisältyä muuntumistuotteiden uusi testaaminen ja/tai yksilöinti (ks. kohta 1.8.9.5, ensimmäinen kappale), jollei muuntumistuotteiden muodostumista voida kohtuudella arvioida kokemuksen perusteella (esim. tiedot hajoamisreitistä). Koska se, missä määrin testiaineessa oleva hiili muuttuu CO_2:ksi, vaihtelee (riippuen paljolti testiaineen ja mahdollisten muiden substraattien pitoisuudesta, testiolosuhteista ja mikrobiyhteisöstä), tämän testin perusteella ei voida tehdä suoraa estimointia lopullisesta biohajoamisesta kuten DOC Die-Away -testissä, vaan testissä saatava tulos vastaa respirometrisessä testissä saatavaa tulosta. Mineralisaatioaste on näin ollen pienempi tai yhtä suuri kuin lopullisen biohajoamisen vähimmäistaso. Jotta lopullisesta biohajoamisesta saataisiin täydellisempi käsitys (mineralisaatio ja sitoutuminen biomassaan), ^{14}C:n faasijakauman analyysi tulisi tehdä testin lopussa (ks. liite 1). Hiukkasissa oleva ^{14}C koostuu bakteeribiomassaan sitoutuneesta ^{14}C:sta ja orgaanisiin partikkeleihin kiinnittyneestä ^{14}C:sta.

2.3 TESTIN VALIDITEETTI

Jos vertailuaine ei hajoa ennakoidussa ajassa (aniliinin ja natriumbentsoaatin odotettu hajoamisaika on yleensä alle 2 viikkoa), testin validiteettia on epäiltävä ja se on tarkistettava. Vaihtoehtoisesti testi toistetaan uudella vesinäytteellä. Menetelmän ISO-yhteistutkimuksessa (*ring test*), johon osallistui seitsemän laboratoriota eri puolilla Eurooppaa, ”adaptoituneet” hajoamisen nopeusvakiot aniliinille vaihtelivat välillä 0,3–1,7 päivä$^{-1}$. Keskiarvo oli 0,8 päivä$^{-1}$ 20 °C:ssa keskivirheellä ± 0,4 päivä$^{-1}$ ($t_{½}$ = 0,9 päivää). Lag-vaiheet keskivät tyypillisesti 1–7 päivää. Tutkituissa testivesissä kirjattiin olevan bakteeribiomassa, joka vastaa 10^3–10^4 pesäkkeitä muodostavaa yksikköä (CFU) ml:ssa. Hajoamisnopeudet runsasravinteisissa keskieurooppalaisissa vesissä olivat suurempia kuin pohjoisissa oligotrofisissa vesissä, mikä voi johtua eroista ravinteisuudessa tai aiemmasta altistuksessa kemiallisille aineille.

Kokonaissaannon (massataseen) tulisi testin lopussa olla 90–110 % radioaktiivisella leimalla merkittyjen aineiden osalta, ja alkuperäisen saannon testin alussa tulisi olla 70–110 % leimaamattomien aineiden osalta. Näitä vaihteluvälejä tulisi kuitenkin pitää pelkästään tavoitteina eikä perusteina testin hyväksymiselle.

▼**M1**

3. **TESTISELOSTE**

Testin tyyppi (onko kyseessä pelaginen vai suspendoituneen sedimentin testi) on ilmoitettava selvästi testiselosteessa, jossa on lisäksi oltava ainakin seuraavat tiedot:

Testiaine ja vertailuaine(et):

— testi- ja vertailuaineen yleisnimet, kemialliset nimet (mieluiten IUPAC ja/tai CAS-nimet), CAS-numerot, rakennekaavat (radioaktiivista merkkiainetta käytettäessä maininta siitä, missä molekyylin osassa ^{14}C on) ja relevantit fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. kohdat 1.5 ja 1.6),

— muuntumistuotteiden yksilöinnissä ja niiden pitoisuuksien määrittämisessä standardeina käytettävien aineiden kemialliset nimet, CAS-numerot, rakennekaavat (radioaktiivista merkkiainetta käytettäessä maininta siitä, missä molekyylin osassa ^{14}C on) ja relevantit fysikaalis-kemialliset ominaisuudet,

— testi-vertailuaineen puhtaus (epäpuhtaudet),

— merkkiaineella leimatun kemikaalin radiokemiallinen puhtaus ja spesifinen aktiivisuus (tapauksen mukaan).

Pintavesi:

Vesinäytteestä on ilmoitettava seuraavat vähimmäistiedot:

— näytteenottopaikan sijainti ja kuvaus, mukaan luettuina taustatiedot saastumisesta, jos ne ovat saatavissa,

— näytteenottopäivä ja -ajankohta,

— ravinteet (kokonais-N, ammonium, nitriitti, nitraatti, kokonais-P, liuennut ortofosfaatti),

— näytteenottosyvyys,

— näytteen ulkonäkö (esim. väri ja sameus),

— DOC ja TOC,

— biokemiallinen hapentarve (BOD),

— lämpötila ja pH näytteenottopaikassa näytteenottoajankohtana,

— happipitoisuus ja hapetus-pelkistyspotentiaali (redoxpotentiaali) (vain siinä tapauksessa, että aerobiset olosuhteet eivät ole ilmeiset),

— suolapitoisuus tai johtavuus (meri- ja murtoveden tapauksessa),

— suspendoitunut kiintoaines (jos näyte on samea),

— mahdolliset muut relevantit tiedot näytteenottopaikasta näytteenottoajankohtana (esim. tiedot jokien tai merivirtojen nykyisistä tai aiemmista virtausnopeuksista, merkittävistä päästöistä paikan läheisyydessä ja päästöjen tyypistä, näytteenottoajankohtaa edeltäneet sääolot),

ja vaihtoehtoisesti:

— mikrobibiomassa (esim. AODC (suoralaskenta akridiinioransivärjäyksen jälkeen) tai pesäkkeitä muodostavat yksiköt),

▼M1

— epäorgaaninen hiili,

— klorofylli a:n pitoisuus spesifisenä leväbiomassan arviona.

Jos tehdään suspendoituneen sedimentin testi, tulisi lisäksi antaa seuraavat tiedot sedimentistä:

— sedimentin keräyssyvyys,

— sedimentin ulkonäkö (värillinen, sakkainen, lietteinen tai hiekkainen),

— koostumus (esim. prosentteina karkeaa hiekkaa, hienoa hiekkaa, lietettä ja savea),

— suspendoituneen kiintoaineksen kuivapaino g/l, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus tai WLOI (painonmenetys kuumennuksen jälkeen) orgaanisen ainesisällön mittana,

— pH,

— happipitoisuus ja hapetus-pelkistyspotentiaali (redoxpotentiaali) (vain siinä tapauksessa, että aerobiset olosuhteet eivät ole ilmeiset).

Testiolosuhteet:

— keräyksen ja laboratoriotestissä käytön välinen aika, näytteen varastointi ja esikäsittely, kokeiden tekopäivät,

— annosteltu testiaineen määrä, testipitoisuus ja vertailuaine,

— testiaineen annostelumenetelmä, mukaan luettuna mahdollinen liuottimien käyttö,

— käytetty pintaveden ja sedimentin (jos sitä käytetään) volyymi ja kullakin aikavälillä näytteeksi otettu volyymi,

— kuvaus käytetystä testijärjestelmästä.

Jos testiä ei ole tarkoitus tehdä pimeässä, tiedot ”heikon valon” olosuhteista;

— tiedot steriilien kontrollien valmistukseen käytettävästä menetelmästä tai menetelmistä (esim. lämpötila, autoklaavikäsittelyjen ajankohta ja lukumäärä),

— inkubointilämpötila,

— tiedot analyysitekniikoista ja menetelmästä tai menetelmistä, joita käytetään radiokemiallisiin mittauksiin sekä massataseen tarkistamiseen ja faasijakauman mittauksiin (jos ne tehdään),

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

Tulokset:

— saantoprosentit (ks. kohta 1.7.1),

— käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus ja herkkyys, mukaan luettuina havaitsemisraja (LOD) ja määritysraja (LOQ) (ks. kohta 1.7.2),

▼**M1**

— kaikki mitatut tiedot (mukaan luettuina näytteenottoajankohdat) ja lasketut arvot taulukkomuodossa sekä hajoamiskäyrät; kunkin testipitoisuuden ja kunkin rinnakkaisen testipullon osalta ilmoitetaan lineaarinen korrelaatiokerroin logaritmisen käyrän kaltevuudelle, arvioitu lag-vaihe ja ensimmäisen kertaluvun tai pseudo-ensimmäisen kertaluvun nopeuskerroin (jos mahdollista) sekä vastaava hajoamisen puoliintumisaika (t_{50}),

— relevantit arvot ilmoitetaan yksittäisissä rinnakkaisnäytteissä saatujen tulosten keskiarvoina (esim. lag-vaiheen pituus, hajoamisen nopeusvakio ja hajoamisen puoliintumisaika (t_{50})),

— järjestelmä luokitellaan joko ei-adaptoituneeksi tai adaptoituneeksi päätellen hajoamiskäyrän ulkonäöstä ja mahdollisesta testipitoisuuden vaikutuksesta,

— lopullisen massatasetarkistuksen tulokset ja faasijakaumamittausten tulokset (jos ne on tehty),

— mineralisoitunut ^{14}C-fraktio ja (käytettäessä erityisiä analyyseja) primaarisen hajoamisen lopullinen taso,

— merkittävien muuntumistuotteiden yksilöinti, molaarinen pitoisuus ja prosenttiosuus (ks. kohta 1.8.9.5, ensimmäinen kappale) (tapauksen mukaan),

— oletettu muuntumisreitti (tapauksen mukaan),

— tulosten pohdinta.

4. **KIRJALLISUUS**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

4. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394–401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274–283.

11. ISO/CD 14592–1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/-sediment suspensions.

▼M1

Liite 1

^{14}C:n faasijakauma

Testimenettelyn tarkistamiseksi orgaanisen ^{14}C:n kokonaisaktiivisuuden (TOA) normaalimittausten lisäksi tulisi tehdä massataseen mittauksia tekemällä muodostuneen $^{14}CO_2$:n suora määritys sen jälkeen, kun se on erotettu imeyttimeen (ks. liite 3). Positiivinen $^{14}CO_2$:n muodostuminen on itsessään suora osoitus siitä, että kyseessä on biohajoaminen eikä abioottinen hajoaminen tai muu häviämisprosessi, kuten haihtuminen tai sorptio. Hyödyllisiä lisätietoja, jotka tarkentavat biohajoamisen luonnetta, voidaan saada mittauksista, jotka koskevat TOA:n jakautumista liukoiseen hiileen (liukoisen orgaanisen ^{14}C:n aktiivisuus, DOA) ja partikkelimuodossa olevaan hiileen (partikkelimuodossa olevan orgaanisen ^{14}C:n aktiivisuus, POA) sen jälkeen, kun partikkelimuodossa oleva hiili on erotettu kalvosuodatuksella tai sentrifugoimalla. POA muodostuu mikrobibiomassaan ja muihin partikkeleihin kiinnittyneestä testiaineesta sekä siitä testiaineessa olevasta hiilestä, joka on käytetty uuden solumateriaalin synteesiin ja joka näin ollen sisältyy biomassan hiukkasfraktioon. Liukoisen orgaanisen ^{14}C:n muodostuminen voidaan arvioida määrittämällä DOA biohajoamisen lopussa (biohajoamista ajan funktiona kuvaavan käyrän tasanne).

Jäännös-^{14}C:n faasijakauma estimoidaan valituissa näytteissä suodattamalla näytteitä kalvosuodattimella, jonka huokoskoko on 0,22–0,45 μm ja jonka materiaali ei adsorboi merkittäviä määriä testiainetta (polykarbonaattisuodattimet voivat olla sopivia). Jos testiaineen sorptio suodattimeen on liian suurta, jotta sen voisi jättää huomiotta (tarkistettava ennen koetta), nopeaa sentrifugointia (2 000 g; 10 min) voidaan käyttää suodatuksen sijaan.

Suodosta tai sentrifugaattia käsitellään siten, kuin kuvataan liitteessä 3 suodattamattomien näytteiden osalta. Kalvosuodattimet liuotetaan sopivaan tuikenesteeseen, minkä jälkeen laskenta tapahtuu tavalliseen tapaan, yleensä käyttäen pelkästään ulkoisen standardin menetelmää vaimennuksen korjaamiseen tai käyttämällä hapetinta. Jos on käytetty sentrifugointia, hiukkasfraktiosta muodostettu pelletti suspendoidaan uudelleen 1–2 ml:aan tislattua vettä ja pannaan tuikelaskentapulloon. Tämän jälkeen tehdään kaksi huuhtelua käyttäen 1 ml tislattua vettä, ja huuhteluvesi lisätään pulloon. Tarvittaessa suspensio voidaan yhdistää geeliin nestetuikelaskennan suorittamiseksi.

▼M1

Liite 2

Puolijatkuva prosessi

Inkubointia voidaan joutua jatkamaan pitkään, jopa useita kuukausia, jotta heikosti hajoavat aineet hajoaisivat riittävästi. Testin kesto ei tavallisesti saisi ylittää 60:tä päivää, jollei alkuperäisen vesinäytteen ominaisuuksia pidetä yllä uudistamalla testisuspensiota. Testin kesto voidaan kuitenkin pidentään enimmillään 90 päivään ilman, että testisuspensiota tarvitsee uudistaa, jos testiaineen hajoaminen on alkanut ensimmäisten 60 päivän aikana.

Inkuboinnin kestäessä pitkään mikrobiyhteisön diversiteetti voi vähentyä eri häviämisprosessien vuoksi ja siksi, että olennaisia ravinteita ja primaarisia hiilisubstraatteja saattaa hävitä vesinäytteestä. Siksi suositellaan käytettäväksi puolijatkuvaa testiä, jolla hitaasti hajoavien aineiden hajoamisnopeus voidaan määrittää riittävästi. Puolijatkuvaa prosessia tulisi käyttää testin alusta alkaen, jos aiemman kokemuksen perusteella odotetaan tarvittavan kolmen kuukauden inkubointiaika, jotta testiaine hajoaisi 20 prosenttia. Vaihtoehtoisesti normaali panostesti (*batch*) voidaan muuttaa testin aikana puolijatkuvaksi testiksi, jos testiaineen hajoamista ei ole tapahtunut noin 60 päivän kuluessa panostestimenettelyä käyttäen. Puolijatkuva menettely voidaan lopettaa ja testiä jatkaa panostestinä, kun hajoamista on tapahtunut merkittävästi (esim. > 20 %).

Puolijatkuvassa testissä noin kolmasosa testisuspension määrästä korvataan kahden viikon välein vasta otetulla uudella vedellä, johon on lisätty testiaine alkuperäisessä pitoisuudessa. Samoin sedimentti lisätään uuteen veteen alkuperäisessä pitoisuudessa (0,01–1 g/l), jos tehdään (vaihtoehtoinen) suspendoituneen sedimentin testi. Tehtäessä testiä suspendoituneella kiinteällä sedimentillä on tärkeää, että järjestelmä pidetään täysin suspendoituneena myös korvattaessa vettä uudella ja että kiintoaineksen ja veden oloaika järjestelmässä on sama, koska muuten järjestelmä ei ehkä halutulla tavalla vastaa homogeenista vesijärjestelmää, jossa ei ole faaseja. Näistä syistä suspendoituneen sedimentin alkuperäisen pitoisuuden tulisi puolijatkuvaa menettelyä käytettäessä mieluiten olla annetun vaihteluvälin alapäässä.

Testiohjeen mukainen testiaineen lisääminen edellyttää, että testiaineen alkuperäistä pitoisuutta ei ylitetä testisuspension osittaisen uudistamisen yhteydessä ja että näin vältetään adaptaatio, joka usein tapahtuu, kun testiaine on suurina pitoisuuksina. Koska prosessiin kuuluu sekä uudelleensiirrostus että poistuneiden ravinteiden ja primaaristen substraattien korvaaminen, alkuperäinen mikrobidiversiteetti palautuu ennalleen ja testin kestoa voidaan jatkaa periaatteessa loputtomiin. Puolijatkuvaa menettelyä käytettäessä on tärkeää huomata, että testiaineen jäännöspitoisuus on korjattava kunkin uudistamisen yhteydessä lisättyihin ja poistettuihin testiainemääriin nähden. Testiaineen kokonaispitoisuuden ja liukoisen pitoisuuden voidaan katsoa olevan samoja sellaisten yhdisteiden tapauksessa, joiden osalta sorptio on vähäinen. Sorptio on testiohjeen mukaisissa olosuhteissa (0,1–1 g kiintoainesta/l) merkityksetön (< 5 %) aineille, joiden log K_{ow} < 3 (koskee neutraaleja, lipofiilisiä yhdisteitä). Tämä käy ilmi seuraavasta esimerkistä: 0,1 g/l kiintoainesta vastaa karkeasti 10 mg:aa hiiltä litraa kohti (hiilifraktio f_C = 0,01). Olkoon

(testiaineen) log K_{ow} = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

ja jakaantumiskerroin, $K_d = f_C \times K_{oc}$

Tällöin liuennut fraktio kokonaispitoisuudesta (C-vesi (C_w)/C-kokonais (C_t) on:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/-(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Liite 3

$^{14}CO_2$:n määritys

Epäsuora $^{14}CO_2$:n määritys

Normaalimittauksissa epäsuora menetelmä on tavallisesti vähiten aikaa vievä ja tarkin menetelmä, jos testiaine ei ole haihtuva eikä muodosta haihtuvia muuntumistuotteita. Suodattamattomia näytteitä (esim. 5 ml kukin) lisätään tuikelaskentapulloihin. Sopiva alkuperäinen aktiivisuus näytteissä on 5 000 dpm–10 000 dpm (80–170 Bq), ja sen on oltava vähintään noin 1 000 dpm. CO_2 poistetaan sen jälkeen, kun näyte on happamoitettu pH-arvoon 2–3 yhdellä tai kahdella tipalla väkevää H_3PO_4:a tai HCl:a. CO_2 voidaan poistaa poreiluttamalla ilmalla noin 1/2–1 tunnin ajan. Vaihtoehtoisesti pulloja voidaan ravistaa voimakkaasti 1–2 tunnin ajan (esim. mikrotiitterilevyjen ravistimessa) tai jättää kevyempään ravistukseen yön yli. CO_2:n poiston tehokkuus on tarkistettava (ja tarvittaessa jatkettava ilmastus- tai ravistusaikaa). Vesinäytteiden laskentaan sopiva tuikeneste lisätään, näyte homogenisoidaan sekoittimessa ja radioaktiivisuus määritetään nestetuikelaskennalla vähentäen nollanäytteissä havaittu tausta-aktiivisuus (F_B). Jollei testivesi ole selvästi värjääntynyt tai sisällä suurta hiukkaspitoisuutta, näytteissä havaittava vaimennus on tavallisesti yhtä suurta kaikissa ja sen korjaamiseksi riittää ulkoisen standardin käyttö. Jos testivesi on selvästi värjääntynyttä, vaimennus voidaan joutua korjaamaan sisäisen standardin lisäyksellä. Jos hiukkaspitoisuus on suuri, homogeenistä liuosta tai geeliä ei ehkä saada aikaan tai vaimennus saattaa vaihdella merkittävästi näytteiden välillä. Tällöin voidaan käyttää jäljempänä testilietteille kuvattua menetelmää. Jos testi suoritetaan suspendoituneen sedimentin testinä, $^{14}CO_2$:n epäsuora mittaus voidaan tehdä ottamalla homogeeninen 10 ml:n näyte testivettä/suspensiota ja erottamalla faasit sentrifugoimalla sopivalla nopeudella (esim. 40 000 m/s^2 15 min). Vesifaasia käsitellään sitten edellä kuvatulla tavalla. Partikkelimuodossa olevan ^{14}C:n aktiivisuus (POA) määritetään suspendoimalla sedimentti uudelleen pieneen määrään tislattua vettä, panemalla se tuikelaskentapulloihin ja lisäämällä tuikeneste geelin muodostamiseksi (tätä varten on olemassa erityisiä tuikenesteitä). Hiukkasten luonteesta (esim. niiden orgaanisen aineen sisällöstä) riippuen näytettä voidaan käsitellä yön yli kudoksen liukenemista edistävällä aineella ja sen jälkeen homogenisoida sekoittimessa ennen tuikenesteen lisäämistä. Vaihtoehtoisesti POA voidaan määrittää hapen määrän ylittävällä poltolla käyttäen hapetinta. Sisäiset standardit tulisi aina ottaa lukuun laskennassa, ja vaimennus voi olla tarpeen korjata sisäisen standardin lisäyksellä kunkin yksittäisen näytteen osalta.

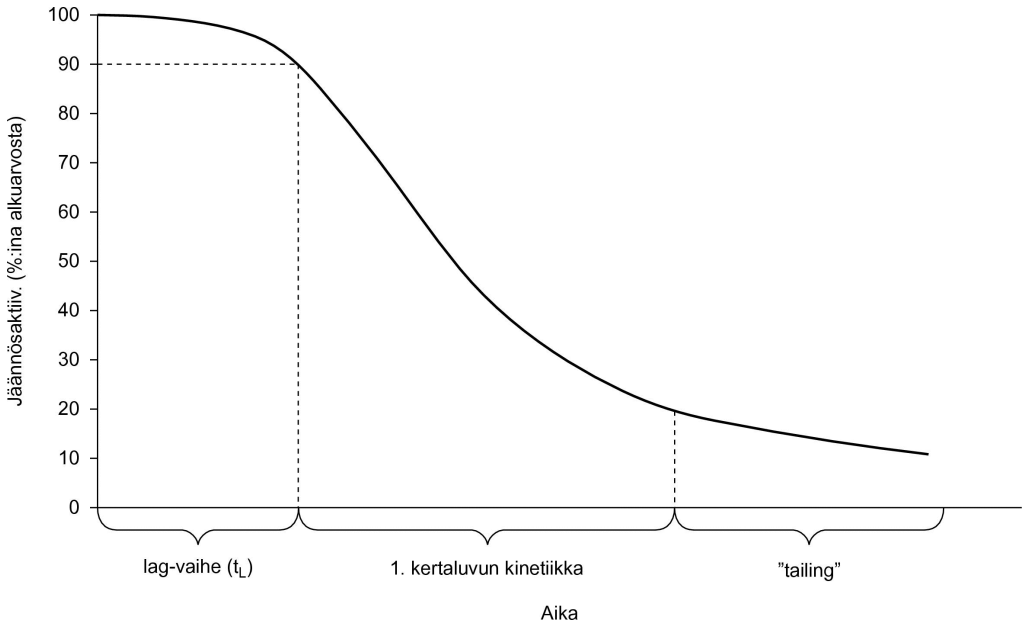
Suora $^{14}CO_2$:n määritys

Jos muodostuneesta $^{14}CO_2$:sta tehdään suora määritys, testiin tulisi ottaa useampia testipulloja testin alussa. Kussakin mittauskohdassa otetaan näytteeksi kokonaisia testipulloja, niiden sisältö happamoitetaan pH-arvoon 2–3 ja kerätään $^{14}CO_2$ sisäiseen (testin alussa kunkin testipullon sisään asetettuun) tai ulkoiseen absorbointijärjestelmään. Absorboivana aineena voidaan käyttää emästä (esim. 1 N NaOH -liuos tai NaOH-pelletti), etanoliamiinia tai etanoliamiinipohjaista absorbenttia tai kaupallisesti saatavilla olevia absorbentteja. $^{14}CO_2$:n suoraa määritystä varten testipullot tulisi sulkea esimerkiksi butyylikumikalvolla.

▼**M1**

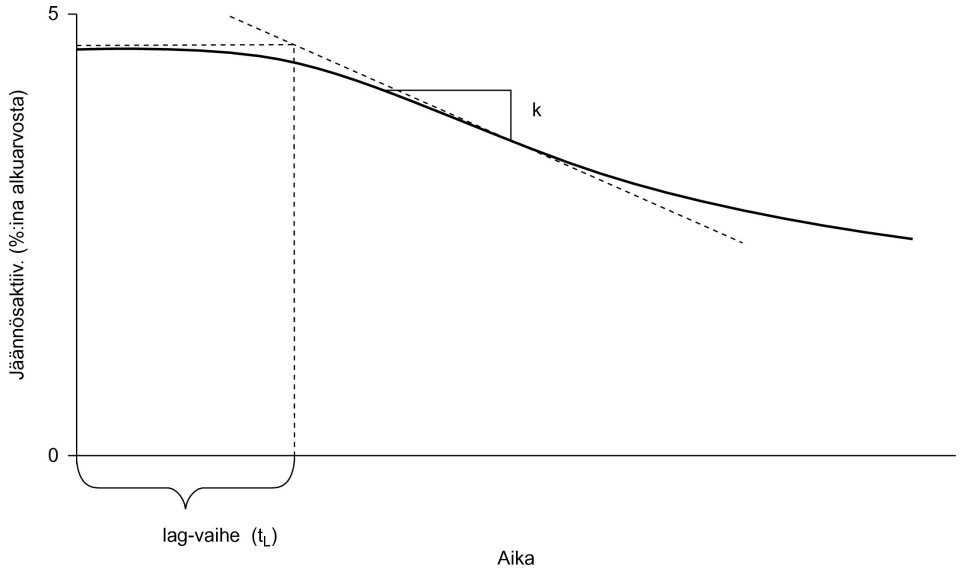
Kuva 1a

Esimerkki aritmeettisesta käyrästä (jäännösaktiivisuus vs. aika)



Kuva 1b

Esimerkki puolilogaritmisesta käyrästä (ln jäännösaktiivisuus vs. aika)



▼M1

C.26. LIMASKOJEN (*LEMNA* SP.) KASVUNESTYMISTESTI

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 221, 2006 (1). EU:n viranomaiset ovat olleet laajalti sitä mieltä, että *Lemna*-testi on sopiva vaihtoehto levätestille silloin, kun aineet ovat voimakkaan värisiä (2)(3).

1.1 JOHDANTO

Tällä testimenetelmällä arvioidaan aineiden myrkyllisyyttä *Lemna*-sukua (limaskat) oleville makean veden kasveille. Menetelmä perustuu olemassa oleviin testiohjeisiin (4)(5)(6)(7)(8)(9), mutta niitä on muutettu viimeaikaisten tutkimustulosten ja keskeisiä kysymyksiä koskevien konsultointien pohjalta. Ehdotettu menetelmä on validoitu kansainvälisellä yhteistutkimuksella (ring test) (10).

Testimenetelmässä kuvataan myrkyllisyyden testausta, jossa käytetään *Lemna gibba*- ja *Lemna minor* -lajeja. Kumpaakin lajia on tutkittu laajalti ja käytetty edellä mainituissa standardeissa. *Lemna*-suvun lajien taksonomia on hankala, koska fenotyyppejä on monta. Vaikka *Lemna*-suvussa voi esiintyä geneettistä vaihtelevuutta vasteessa myrkyllisiin aineisiin, vaihtelevuuden syistä ei toistaiseksi ole saatavilla riittävästi tietoja, joiden pohjalta voitaisiin suositella tietyn kloonin käyttöä tässä testimenetelmässä. On syytä huomata, että testiä ei suoriteta aksenikaalisesti, vaan testin eri vaiheissa toteutetaan toimia, joilla muista eliöistä johtuva kontaminaatio pyritään pitämään mahdollisimman pienenä.

Testimenetelmässä kuvataan yksityiskohtaisesti testausta, jossa testiliuos vaihtuu (semistaattinen ja läpivirtausmenetelmä) tai ei vaihdu (staattinen menetelmä). Testin tavoitteista ja sääntelyvaatimuksista riippuen on suositeltavaa harkita semistaattisten tai läpivirtausmenetelmien käyttöä muun muassa sellaisten aineiden testauksessa, jotka häviävät nopeasti liuoksesta haihtumisen, valohajoamisen, saostumisen tai biohajoavuuden vuoksi. Tästä annetaan tarkempia ohjeita kirjallisuusviitteessä (11).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä ja lyhenteitä:

Biomassa: Populaatiossa olevan elävän materiaalin kuivapaino. Tässä testissä biomassaa mitataan usein epäsuorasti esimerkiksi versojen lukumäärän tai pinta-alan avulla, minkä vuoksi ”biomassa”-termi viittaa myös näihin korvaaviin menetelmiin.

Kloroosi: Versosolukon kellastuminen.

Klooni: Eliö tai solu, joka on saanut alkunsa yhdestä yksilöstä suvuttoman lisääntymisen tuloksena. Samaan klooniin kuuluvat yksilöt ovat siis geneettisesti identtisiä.

Kolonia: Versojen muodostama yhdyskunta, jossa emo- ja tytäryksilöt (yleensä 2–4 yksilöä) ovat kiinnittyneet toisiinsa. Kutsutaan joskus kasviksi.

▼M1

EC_x: Testiviljelyaineeseen liuenneen testiaineen pitoisuus, jossa *Lemna*n kasvu vähenee x prosenttia (esimerkiksi 50 prosenttia) määrätyn altistusajan kuluessa (altistusaika on mainittava erikseen, jos se poikkeaa testin kokonaiskestosta tai normaalista kestosta). Jotta kasvunopeudesta ja tuotoksesta johdetut EC-arvot erottuisivat selvästi toisistaan, edellisestä käytetään symbolia ”E_rC” ja jälkimmäisestä symbolia ”E_yC”, joiden jälkeen mainitaan mittausmuuttuja, esimerkiksi E_rC (versojen lukumäärä).

Läpivirtaustesti: Testi, jossa testiliuokset vaihtuvat jatkuvasti.

Verso: Limaskakasvin yksittäinen lehden kaltainen rakenne. Se on pienin lisääntymiskykyinen yksikkö eli yksilö.

Kupruisuus: Kupuroiden tai turpoamien esiintyminen versoissa.

Kasvu: Mittausmuuttujan, kuten versojen lukumäärän, kuivapainon, märkäpainon tai versojen pinta-alan, kasvaminen testijakson aikana.

Kasvunopeus (**keskimääräinen spesifinen kasvunopeus**): Biomassan logaritminen kasvu altistuksen aikana.

Pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC): Pienin testattu pitoisuus, jossa aineella havaitaan olevan tietyn altistusajan kuluessa tilastollisesti merkittävä kasvua vähentävä vaikutus verrattuna kontrolliin (kun $p < 0,05$). Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

Mittausmuuttujat: Kaikentyyppiset muuttujat, jotka mitataan testin päätepisteen ilmaisemiseksi yhden tai useamman erilaisen vastemuuttujan avulla. Tässä menetelmässä mittausmuuttujia ovat versojen lukumäärä, versojen pinta-ala sekä tuorepaino ja kuivapaino.

Monokulttuuri: Yhtä kasvilajia sisältävä viljelmä.

Nekroosi: Kuollut (valkoinen tai veden turvottama) versosolukko.

Pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC): Lähin LOEC-pitoisuutta pienempi testipitoisuus.

Fenotyyppi: Eliön havaittavissa olevat ominaisuudet, jotka määräytyvät eliön geenien ja ympäristön välisestä vuorovaikutuksesta.

Vastemuuttujat: Muuttujat, joiden avulla arvioidaan myrkyllisyyttä. Vastemuuttujat johdetaan erilaisia laskentamenetelmiä käyttämällä mistä tahansa mitatusta muuttujasta, joka kuvaa biomassaa. Tässä menetelmässä kasvunopeudet ja tuotos ovat vastemuuttujia, jotka on johdettu mittausmuuttujista, kuten versojen lukumäärästä, versojen pinta-alasta, tuorepainosta tai kuivapainosta.

Semistaattinen (ajoittaisvaihtoinen) testi: Testi, jossa testiliuos vaihdetaan tietyin väliajoin testin aikana.

Staattinen testi: Testi, jossa testiliuosta ei vaihdeta testin aikana.

▼M1

Testin päätepiste: Kuvaa yleistä tekijää, joka testin tavoitteen mukaisesti muuttuu testikemikaalin vaikutuksesta verrattuna kontrolliin. Tässä menetelmässä testin päätepisteenä on kasvun estyminen, joka voidaan ilmaista erilaisilla vastemuuttujilla, jotka perustuvat yhteen tai useampaan mittausmuuttujaan.

Testiviljelyaine: Täydellinen synteettinen ravinneliuos, jossa testikasvit kasvavat, kun ne altistetaan testiaineelle. Yleensä testiaine liuotetaan testiviljelyaineeseen.

Tuotos: Altistusajan lopussa mitattu biomassaa ilmaisevan mittausmuuttujan arvo, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu saman mittausmuuttujan arvo.

1.3 TESTIN PERIAATE

Lemna-sukuun kuuluvien eksponentiaalisesti kasvavien kasviviljelmien annetaan kasvaa seitsemän päivän ajan monokulttuureina testiaineen eri pitoisuuksissa. Testin tavoitteena on kvantifioida testiaineeseen liittyvät vaikutukset kasvien kasvuun tämän ajan kuluessa tiettyjen mittausmuuttujien arvioinnin perusteella. Ensisijaisena mittausmuuttujana on versojen lukumäärä. Lisäksi mitataan ainakin yhtä muuta mittausmuuttujaa (versojen kokonaispinta-alaa, kuivapainoa tai tuorepainoa), koska eräät aineet voivat vaikuttaa huomattavasti enemmän muihin mittausmuuttujiin kuin versojen lukumäärään. Testiaineeseen liittyvien vaikutusten kvantifioimiseksi testiliuoksissa tapahtunutta kasvua verrataan kontrolliryhmässä tapahtuneeseen kasvuun, minkä jälkeen määritetään pitoisuus, jossa kasvu estyy ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan EC_x-arvona (esimerkiksi EC_{50}).

Testin loppupisteenä on kasvun estyminen, joka ilmenee mittausmuuttujan logaritmisesta kasvusta (keskimääräisestä spesifisestä kasvunopeudesta) altistusaikana. Testiliuossarjassa mitattujen keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien avulla määritetään pitoisuus, jossa kasvunopeus vähenee ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan E_rC_x-arvona (esimerkiksi E_rC_{50}).

Toinen testimenetelmässä käytetty vastemuuttuja on tuotos, jota voidaan tarvita joissakin maissa erityisten sääntelyvaatimusten täyttämiseksi. Sillä tarkoitetaan altistusajan lopussa mitattua mittausmuuttujien arvoa, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu mittausmuuttujien arvo. Testiliuossarjassa mitatun tuotoksen avulla määritetään pitoisuus, jossa tuotos vähenee ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan E_yC_x-arvona (esimerkiksi E_yC_{50}).

Tilastollisesti voidaan määrittää myös pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) sekä pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC).

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Käytettävissä on oltava analyysimenetelmä, jolla testiviljelyaineessa oleva testiaine voidaan kvantifioida riittävän herkästi.

▼M1

Testiainetta koskevia tietoja, joista voi olla hyötyä päätettäessä testiolosuhteista, ovat rakennekaava, puhtaus, vesiliukoisuus, stabiilius vedessä ja valossa, pK_a, K_{ow}, höyrynpaine ja biohajoavuus. Vesiliukoisuutta ja höyrynpainetta voidaan käyttää laskettaessa Henryn vakiota, josta voidaan päätellä, onko todennäköistä, että testiainetta häviää merkittävästi testin aikana. Tämän perusteella voidaan päättää, vaativatko tällaiset häviöt erityistoimia. Jos testiaineen liukoisuutta ja stabiiliutta koskevat tiedot ovat epäluotettavia, nämä ominaisuudet olisi arvioitava testiolosuhteissa, toisin sanoen siinä viljelyaineessa, lämpötilassa ja valaistuksessa, joita testissä käytetään.

Jos on erityisen tärkeää säädellä testiviljelyaineen pH:ta, esimerkiksi testattaessa metalleja tai hydrolyyttisesti epästabiileja aineita, on suositeltavaa lisätä testiviljelyaineeseen puskuria (ks. 1.7.4 kohdan ensimmäinen kappale). Kirjallisuusviitteessä (11) annetaan lisäohjeita sellaisten aineiden testauksesta, joiden fysikaaliskemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

1.5 VERTAILUAINE

Testimenetelmä voidaan tarkistaa testaamalla vertailuaine (-aineet), kuten 3,5-dikloorifenoli, jota on käytetty kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (10). Vertailuaine on suotavaa testata vähintään kahdesti vuodessa tai, jos testausta tehdään harvemmin, rinnakkain määritettäessä testiaineen myrkyllisyyttä.

1.6 TESTIN VALIDITEETTI

Jotta testi olisi validi, versojen lukumäärän on kaksinkertaistuttava kontrolliviljelmässä alle 2,5 päivässä (60 tunnissa), mikä vastaa noin seitsenkertaista kasvua seitsemän päivän kuluessa, kun keskimääräinen spesifinen kasvunopeus on 0,275 päivää kohden. Käytettäessä tässä testimenetelmässä kuvattuja testiliuoksia ja -olosuhteita tämä vaatimus voidaan täyttää käyttämällä staattista testausta (8). Vaatimus voidaan oletettavasti täyttää myös sellaisissa testiolosuhteissa, joissa käytetään semistaattista tai läpivirtausmenetelmää. Kaksinkertaistumisajan laskemista käsitellään tarkemmin kohdassa 2.1.

1.7 MENETELMÄN KUVAUS

1.7.1 **Välineet**

Kaikkien välineiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Viljelyyn ja testaukseen käytettävien lasiastioiden on oltava steriilejä, ja ne on puhdistettava kemiallisista epäpuhtauksista, jotka voivat päästä testiviljelyaineeseen. Koeastioiden on oltava niin tilavia, että eri kolonioiden versot voivat kasvaa kontrolliastioissa peittämättä toisiaan testin lopussa. Ei ole haitaksi, vaikka juuret ulottuvat testiastioiden pohjaan, mutta on suositeltavaa, että kaikki koeastiat ovat syvyydeltään vähintään 20 mm ja tilavuudeltaan vähintään 100 ml. Koeastioiden valinnalla ei ole muuten ratkaisevaa merkitystä, jos nämä vaatimukset täyttyvät. Sopivan kokoiset dekantterilasit, kiteytysmaljat ja lasiset petrimaljat ovat kaikki osoittautuneet käyttökelpoisiksi. Haihtumisen ja tahattoman kontaminaation minimoimiseksi koeastiat on peitettävä, mutta samalla on huolehdittava riittävästä ilmanvaihdosta. Koeastiat ja varsinkaan niiden sulkimet eivät saa varjostaa tai muuttaa valon spektriominaisuuksia.

▼M1

Viljelmiä ja koeastioita ei saa säilyttää toistensa kanssa. Sen vuoksi on paras käyttää erillisiä ilmastoituja kasvatuskaappeja, inkubaattoreita tai huoneita. Valaistuksen ja lämpötilan on oltava säädettävissä, ja ne on pidettävä tasaisina (ks. kohta 1.7.8).

1.7.2 **Koe-eliö**

Testissä käytetään *Lemna gibba*- tai *Lemna minor* -lajia. Myrkyllisyyden testauksessa käytettyjä limaskalajeja kuvataan lyhyesti lisäyksessä 1. Kasvimateriaali voidaan hankkia kantakokoelmasta, toisesta laboratoriosta tai luonnosta. Jos kasvit kerätään luonnosta, niitä on viljeltävä testissä käytettävässä viljelyaineessa vähintään kahdeksan viikkoa ennen käyttöä. Paikoissa, joista alkuviljelmien kasvit kerätään, ei saa olla ilmeisiä kontaminaatiolähteitä. Jos kasvit hankitaan toisesta laboratoriosta tai kantakokoelmasta, niitä on viljeltävä vastaavalla tavalla kolmen viikon ajan. Kasvimateriaalin lähde sekä testauksessa käytettävät lajit ja klooni (jos tiedossa) on aina ilmoitettava.

Testissä on käytettävä monokulttuureita, joissa ei ole muita organismeja, kuten leviä tai alkueläimiä, näkyvinä epäpuhtauksina. *L. minor* -lajin terveet kasvit ovat kolonioina, joissa on 2–5 versoa, kun taas *L. gibba* -lajin terveissä kolonioissa voi olla jopa seitsemän versoa.

Testissä käytettävät kasvit on valittava huolellisesti, koska niiden laatu ja yhtenäisyys vaikuttavat merkittävästi testin tulokseen. Testissä on käytettävä nuoria, nopeasti kasvavia kasveja, joissa ei ole näkyviä vaurioita tai värimuutoksia (kloroosia). Hyvälaatuisen viljelmän tunnistaa siitä, että siinä esiintyy runsaasti vähintään kahdesta versosta koostuvia kolonioita. Jos viljelmässä on monia yksittäisiä versoja, se on merkki ympäristörasituksesta, kuten ravinteiden puutteesta, eikä testissä saa käyttää tällaisista viljelmistä peräisin olevaa kasvimateriaalia.

1.7.3 **Viljely**

Viljelmien ylläpidon helpottamiseksi (esimerkiksi silloin, kun *Lemna*-testejä ei aiota tehdä tiettynä aikana) niitä voidaan säilyttää normaalia heikommassa valaistuksessa ja alhaisemmassa lämpötilassa (4–10 °C). Viljelyä käsitellään tarkemmin lisäyksessä 2. Jos viljelmässä näkyy merkkejä levien ja muiden eliöiden aiheuttamasta kontaminaatiosta, *Lemna*-versoista on otettava osanäyte, jolle tehdään pintasterilointi, jonka jälkeen se siirretään tuoreeseen viljelyaineeseen (ks. lisäys 2). Jäljelle jäävä kontaminoitunut viljelmä on heitettävä pois.

Riittävä määrä kolonioita siirretään aseptisesti vähintään seitsemän päivää ennen testausta tuoreeseen steriiliin viljelyaineeseen, ja kolonioita viljellään 7–10 päivän ajan testiolosuhteissa.

1.7.4 **Testiviljelyaine**

Lemna minor- ja *Lemna gibba* -lajia varten suositetaan erilaisia viljelyaineita, joita kuvataan jäljempänä. On syytä harkita huolellisesti pH-puskurin lisäämistä testiviljelyaineeseen (MOPS (4-morfoliinipropaanisulfonihappo, CAS-numero: 1132-61-2; EINECS-numero: 214-478-5) *L. minor* -lajin viljelyaineeseen ja $NaHCO_3$ *L. gibba* -lajin viljelyaineeseen), jos testiviljelyaineen epäillään voivan reagoida testiaineen kanssa ja vaikuttaa sen myrkyllisyyden ilmentymiseen. Steinbergin viljelyainetta (12) voidaan käyttää, jos validiteettivaatimukset täyttyvät.

▼M1

Ruotsalaisen standardin (SIS) mukaisen *Lemna*-viljelyaineen muunnosta suositetaan käytettäväksi testauksessa, jossa viljellään ja käytetään *L. minor* -lajia. Tämän viljelyaineen koostumus esitetään lisäyksessä 3.

Lisäyksessä 3 kuvattua 20X-AAP-viljelyainetta suositetaan käytettäväksi testauksessa, jossa viljellään ja käytetään *L. gibba* -lajia.

L. minor -lajille soveltuu myös lisäyksessä 3 kuvattu Steinbergin viljelyaine, mutta sitä voidaan käyttää myös *L. gibba* -lajin viljelyssä, jos validiteettivaatimukset täyttyvät.

1.7.5 **Testiliuokset**

Testiliuokset valmistetaan yleensä laimentamalla kantaliuosta. Testiaineen kantaliuokset valmistetaan tavallisesti liuottamalla testiaine viljelyaineeseen.

Testiaineen suurin testattu pitoisuus ei yleensä saa ylittää kyseisen aineen vesiliukoisuutta testiolosuhteissa. On kuitenkin huomattava, että *Lemna*-suvun lajit kelluvat pinnalla ja voivat altistua aineille, jotka kerääntyvät veden ja ilman rajapintaan (esimerkiksi huonosti veteen liukenevat tai hydrofobiset aineet taikka pinta-aktiiviset aineet). Tällaisissa olosuhteissa kasvit altistuvat muille kuin liuoksessa olevalle aineille, ja testipitoisuudet voivat testiaineen ominaisuuksista riippuen ylittää vesiliukoisuuden. Jos testiaine liukenee huonosti veteen, voi olla tarpeen valmistaa kyseisestä aineesta väkevä kantaliuos tai dispersio käyttämällä orgaanista liuotinta tai dispergointiainetta, joilla voidaan helpottaa tarkkojen testiainemäärien lisäämistä testiviljelyaineeseen sekä testiaineen dispersiota ja liukenemista. Tällaisten aineiden käyttöä on vältettävä mahdollisimman pitkälle. Jos liuottimia tai dispergointiaineita käytetään apuna testiliuosten valmistuksessa, niistä ei saa aiheutua fytotoksisuutta. Asetoni ja dimetyyliformamidi ovat esimerkkejä yleisesti käytetyistä liuottimista, jotka eivät aiheuta fytotoksisuutta pitoisuuden ollessa enintään 100 $\mu 1 \cdot l^{-1}$. Jos liuotinta tai dispergointiainetta käytetään, sen lopullinen pitoisuus on ilmoitettava ja pidettävä mahdollisimman pienenä ($\leq$ 100 $\mu l \cdot l^{-1}$), ja liuoksen tai dispergointiaineen pitoisuuden on oltava sama kaikissa käsitellyissä ja kontrolliliuoksissa. Dispergointiaineiden käytöstä annetaan lisäohjeita kirjallisuusviitteessä (11).

1.7.6 **Testi- ja kontrolliryhmät**

Sopivat testipitoisuudet on helpompi valita, jos testiaineen myrkyllisyydestä *Lemna*-lajeille on saatavilla aiempia tietoja esimerkiksi alustavista pitoisuusalueen määrityskokeista. Lopullisessa myrkyllisyystestissä on yleensä oltava vähintään viisi testipitoisuutta, jotka muodostavat geometrisen sarjan. Testipitoisuuksien suhdeluvun ei tulisi olla suurempi kuin 3,2, mutta suurempikin suhdeluku sallitaan, jos pitoisuus-vastekäyrä on laakea. Vähemmän kuin viiden pitoisuuden käyttö on perusteltava. Jokaisesta testipitoisuudesta on tehtävä vähintään kolme toistoa.

Valittaessa testin pitoisuusaluetta (pitoisuusalueen määritystä ja/tai lopullista myrkyllisyystestiä varten) on otettava huomioon seuraavat näkökohdat:

▼M1

— EC_x-pitoisuuden määrittämiseksi testipitoisuudet on valittava siten, että EC_x-arvo on kyseisellä pitoisuusalueella, jotta saavutettaisiin riittävä luottamustaso. Esimerkiksi EC_{50}-pitoisuutta arvioitaessa suurimman testipitoisuuden on ylitettävä EC_{50}-arvo. Jos EC_{50}-arvo on testin pitoisuusalueen ulkopuolella, vastaavat luottamusvälit ovat suuria, jolloin voi olla mahdotonta arvioida mallin tilastollista sopivuutta.

— Jos tavoitteena on arvioida LOEC- tai NOEC-pitoisuus, pienimmän testipitoisuuden on oltava niin pieni, että kasvu ei ole merkittävästi vähäisempää kuin kontrolliryhmässä. Suurimman testipitoisuuden on myös oltava niin suuri, että kasvu on huomattavasti vähäisempää kuin kontrolliryhmässä. Muussa tapauksessa testi on toistettava käyttämällä toista pitoisuusaluetta (jollei suurin pitoisuus ole liukoisuusrajalla tai jollei se ole suurin vaadittu rajapitoisuus, esimerkiksi 100 $mg \cdot l^{-1}$).

Jokaiseen testiin on kuuluttava kontrolliryhmä, jossa ravinneliuos, versojen ja kolonioiden lukumäärä, ympäristöolosuhteet ja menettelyt ovat samat kuin testiryhmässä mutta ilman testiainetta. Jos apuna käytetään liuotinta tai dispergointiainetta, testiin on kuuluttava ylimääräinen kontrollikäsittely, jossa liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuus on sama kuin testiainetta sisältävissä astioissa. Toistoissa kontrolliastioiden (ja liuotinta käytettäessä liuotinta sisältävien astioiden) lukumäärän on oltava vähintään yhtä suuri kuin kunkin testipitoisuuden testaamiseen käytettyjen astioiden lukumäärä ja mielellään kaksinkertainen.

Jos NOEC-pitoisuutta ei tarvitse määrittää, testimenetelmää voidaan muuttaa lisäämällä pitoisuuksien määrää ja vähentämällä toistojen määrää pitoisuutta kohden. Kontrollitoistoja on kuitenkin oltava vähintään kolme.

1.7.7 **Altistus**

Koloniat, jotka koostuvat 2–4 näkyvästä versosta, siirretään siirrosviljelmästä ja jaetaan satunnaisesti koeastioihin aseptisissa olosuhteissa. Jokaisessa koeastiassa on oltava yhteensä 9–12 versoa. Versoja ja kolonioita on oltava yhtä monta kaikissa koeastioissa. Tästä testimenetelmästä saadut kokemukset ja yhteistutkimusten (ring tests) tulokset ovat osoittaneet, että jos jokaista käsittelyä kohden tehdään kolme toistoa, joissa kaikissa on aluksi 9–12 versoa, käsittelyjen välillä voidaan jo havaita kasvueroja, jotka vastaavat 4–7 prosentin inhibitiota, jos se lasketaan kasvunopeuden perusteella (ja 10–15 prosentin inhibitiota, jos se lasketaan tuotoksen perusteella) (10).

Koeastiat on sijoitettava inkubaattoriin satunnaistetusti, jotta valon voimakkuuden ja lämpötilan spatiaalisista eroista johtuvat vaikutukset olisivat mahdollisimman pienet. Vaatimuksena on myös, että jokaisella havainnointikerralla käytetään lohkoittaista järjestystä tai astioiden satunnaistettua uudelleensijoittelua (joka voidaan tehdä useamminkin).

▼M1

Jos alustava stabiiliustesti osoittaa, että testiaineen pitoisuutta ei voida pitää yllä testin ajan eli 7 päivää (toisin sanoen mitattu pitoisuus vähenee alle 80 prosenttiin mitatusta alkupitoisuudesta), on suositeltavaa käyttää semistaattista testijärjestelmää. Siinä tapauksessa koloniat on altistettava vasta valmistetuille testi- ja kontrolliliuoksille ainakin kahdesti testin aikana (esimerkiksi päivinä 3 ja 5). Testiaineen stabiiliudesta riippuu, kuinka usein koloniat on altistettava vastavalmistetulle viljelyaineelle. Testattaessa hyvin epästabiileja tai haihtuvia aineita pitoisuuksien pitäminen lähes vakioina voi vaatia useampia altistuskertoja. Joissakin tapauksissa voi olla tarpeen käyttää läpivirtausmenetelmää (11)(13).

Tähän testimenetelmään ei kuulu versojen altistaminen ruiskuttamalla, mutta sitä käsitellään kirjallisuusviitteessä (14).

1.7.8 **Inkubaatio-olosuhteet**

Testissä käytetään tasaista lämpimän- tai kylmänvalkoista loistevaloa, jotta valon voimakkuudeksi saadaan 85–135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, kun se mitataan fotosyynteesille suotuisalla aallonpituusalueella (400–700 nm) pisteissä, jotka ovat samalla etäisyydellä valolähteestä kuin *Lemna*-versot (tämä vastaa voimakkuusaluetta 6 500–10 000 luksia). Valon voimakkuus ei saa vaihdella enempää kuin ± 15 prosenttia testialueen yläpuolella. Valoilmaisin- ja valonmittausmenetelmä ja erityisesti anturityyppi vaikuttavat mittausarvoon. Pallomaiset anturit (jotka reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason ylä- ja alapuolelta) ja kosinikorjaimella varustetut anturit (jotka reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason yläpuolelta) ovat suositeltavampia kuin yksisuuntaiset anturit. Ensin mainitut antavat suurempia lukemia mitattaessa tässä kuvatun kaltaista monipisteistä valonlähdettä.

Lämpötilan on oltava koeastioissa 24 ± 2 °C. Yleensä kontrolliviljelyaineen pH-arvo saa kokeen aikana vaihdella enintään 1,5 yksikön verran. Tätä suurempi poikkeama ei kuitenkaan mitätöi testiä, jos validiteettivaatimusten voidaan osoittaa täyttyvän. Erityistapauksissa, esimerkiksi testattaessa epästabiileja aineita tai metalleja, on kiinnitettävä erityistä huomiota pH:n vaihteluun. Tästä annetaan lisäohjeita kirjallisuusviitteessä (11).

1.7.9 **Kesto**

Testi päättyy seitsemän päivän kuluttua kasvien siirtämisestä koeastioihin.

1.7.10 **Mittaukset ja analyyttiset määritykset**

Testin alussa lasketaan ja kirjataan koeastioissa olevien versojen lukumäärä. Tällöin on laskettava kaikki esiin työntyvät ja selvästi näkyvät versot. Normaaleilta ja epänormaaleilta vaikuttavien versojen määrä lasketaan testin alussa, vähintään joka kolmas päivä altistuksen aikana (eli ainakin kaksi kertaa seitsemän päivän jakson aikana) sekä kokeen päättyessä. Kasvien kehityksessä tapahtuvat muutokset rekisteröidään. Niitä ovat esimerkiksi versojen koossa ja ulkonäössä tapahtuvat muutokset, merkit nekroosista, kloroosista tai kupruisuudesta, kolonian hajoaminen tai kelluvuuden heikkeneminen sekä muutokset juurien pituudessa ja ulkonäössä. Lisäksi on rekisteröitävä testiviljelyaineen erityiset ominaisuudet (esimerkiksi liukenemattoman materiaalin esiintyminen ja levien kasvu koeastiassa).

▼**M1**

Versojen lukumäärän laskemisen lisäksi testin aikana arvioidaan myös testiaineen vaikutuksia yhteen (tai useampaan) seuraavista mittausmuuttujista:

i) versojen kokonaispinta-ala;

ii) kuivapaino;

iii) tuorepaino.

Versojen kokonaispinta-alaan liittyy se etu, että se voidaan määrittää jokaisesta testi- ja kontrolliastiasta testin alussa, sen aikana ja sen lopussa. Kuiva- tai tuorepaino on määritettävä testin alussa siirrosviljelmästä otetusta näytteestä, jonka on oltava edustava näyte testin käynnistämiseen käytetystä materiaalista, sekä testin lopussa jokaisesta testi- ja kontrolliastiasta otetusta kasvimateriaalista. Jos versojen pinta-alaa ei mitata, on parempi mitata kuivapaino tuorepainon sijasta.

Versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino ja tuorepaino voidaan määrittää seuraavasti:

i) *Versojen kokonaispinta-ala*: Kaikkien kolonioiden versojen kokonaispinta-ala voidaan määrittää kuva-analyysillä. Koeastiasta ja kasveista voidaan ottaa siluettikuva videokameralla (esimerkiksi sijoittamalla koeastia valolaatikon päälle), ja näin saatu kuva digitalisoidaan. Koeastiassa olevien versojen kokonaispinta-ala voidaan määrittää tekemällä kalibrointi tunnetun pinta-alan tasokuvioiden avulla. Tällöin on huolehdittava siitä, että koeastian reunan aiheuttamat vaikutukset eivät vääristä määritystä. Vaihtoehtoisena mutta työläämpänä menetelmänä on valokuvata koeastiat ja kasvit, leikata näin saatu kolonioiden siluetti ja määrittää niiden pinta-ala käyttämällä lehtialan analysaattoria. Muutkin tekniikat voivat olla käyttökelpoisia (esimerkiksi kolonioiden siluetin pinta-alan ja tietyn pinta-alayksikön välinen painosuhde paperin painon mukaan laskettuna).

ii) *Kuivapaino*: Jokaisesta koeastiasta kerätään kaikki koloniat, jotka huuhdotaan tislatulla tai deionisoidulla vedellä. Kolonioissa oleva ylimääräinen vesi imeytetään paperiin, minkä jälkeen niitä kuivataan 60 °C:ssa, kunnes niiden paino on vakio. Juurenpalaset on otettava mukaan. Kuivapaino on ilmoitettava vähintään 0,1 mg:n tarkkuudella.

iii) *Tuorepaino*: Kaikki koloniat siirretään ennalta punnittuihin polystyreeniputkiin (tai muihin inerttiä materiaalia oleviin putkiin), joiden pyöreissä pohjissa on pieniä (1 mm) aukkoja. Putkia sentrifugoidaan kierrosluvulla 3 000 rpm huoneenlämmössä 10 minuutin ajan. Putket, jotka sisältävät näin kuivatut koloniat, punnitaan uudelleen, ja tuorepaino lasketaan vähentämällä punnitustuloksesta tyhjän putken paino.

1.7.10.1 *Mittausten ja analyyttisten määritysten tiheys*

Käytettäessä staattista testimenetelmää kunkin käsittelyn liuoksen pH on mitattava testin alussa ja lopussa. Jos testimenetelmä on semistaattinen, pH on mitattava jokaisesta erästä ”tuoretta” testiliuosta ennen kutakin vaihtoa ja myös vastaavista ”käytetyistä” liuoksista.

▼M1

Valon voimakkuus kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa on mitattava pisteistä, jotka ovat samalla etäisyydellä valolähteestä kuin *Lemna*-versot. Mittaukset on tehtävä ainakin kerran testin aikana. Viljelyaineen lämpötila surrogaattiastiassa, jota säilytetään kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa samoissa olosuhteissa, on mitattava vähintään kerran päivässä.

Testiaineen pitoisuudet määritetään testin aikana sopivin väliajoin. Staattisissa testeissä vähimmäisvaatimuksena on määrittää pitoisuudet testin alussa ja lopussa.

Semistaattisissa testeissä, joissa testiaineen pitoisuuden ei oleteta pysyvän ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, on analysoitava kaikki vastavalmistetut testiliuokset ja samat liuokset käytettyinä kunkin vaihdon yhteydessä (ks. 1.7.7 kohdan kolmas kappale). Kuitenkin niissä testeissä, joissa testiaineen mitattu alkupitoisuus ei ole ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, mutta joissa voidaan antaa riittävä näyttö siitä, että alkupitoisuudet ovat toistettavissa ja stabiileja (toisin sanoen 80–120 prosenttia alkupitoisuudesta), kemialliset määritykset voidaan tehdä ainoastaan suurimmista ja pienimmistä testipitoisuuksista. Kaikissa tapauksissa on testiaineen pitoisuudet ennen vaihtoa määritettävä vain yhdestä toistossa käytetystä astiasta (tai kaikkien toistoissa käytettyjen astioiden yhdistetystä sisällöstä) kutakin testipitoisuutta kohden.

Läpivirtaustestissä voidaan käyttää samanlaista näytteenottomenettelyä kuin semistaattisessa testissä ja tehdä analyysi testin alussa, puolivälissä ja lopussa, mutta ”käytettyjen” liuosten mittaaminen ei ole aiheellista. Tämäntyyppisessä testissä laimenteen ja testiaineen tai testiaineen kantaliuoksen virtausnopeus on tarkistettava päivittäin.

Jos on näyttöä siitä, että testattavan aineen pitoisuus on pysynyt tyydyttävästi ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten analysointi voi perustua nimellispitoisuuksiin tai mitattuihin alkupitoisuuksiin. Jos pitoisuus poikkeaa enemmän kuin ± 20 prosenttia nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta, tulosten analysoinnin on perustuttava pitoisuuksien geometriseen keskiarvoon altistuksen aikana tai malleihin, jotka kuvaavat testiaineen pitoisuuden vähenemistä (11).

1.7.11 **Rajatesti**

Joissakin tapauksissa, esimerkiksi silloin, kun alustava testi osoittaa, että testiaineella ei ole myrkkyvaikutuksia pitoisuusarvoon 100 $mg \cdot l^{-1}$ saakka tai siihen liukoisuusrajaan asti, joka testiaineella on testiviljelyaineessa (sen mukaan, kumpi näistä on pienempi), voidaan tehdä rajatesti, jossa verrataan yhden kontrolliryhmän ja yhden käsitellyn ryhmän vasteita (pitoisuudessa 100 $mg \cdot l^{-1}$ tai liukoisuusrajaa vastaavassa pitoisuudessa). On erittäin suotavaa analysoida altistuspitoisuus rajatestin tueksi. Kaikki edellä kuvatut testiolosuhteet ja validiteettivaatimukset koskevat myös rajatestiä, lukuun ottamatta käsiteltyjen toistojen määrää, joka on kaksinkertaistettava. Kontrolli- ja käsitellyssä ryhmässä tapahtunutta kasvua voidaan analysoida Studentin t-testin kaltaisella tilastotutkimuksella, jossa verrataan keskiarvoja.

▼M1

2. **TIEDOT JA NIIDEN RAPORTOIMINEN**

2.1 KAKSINKERTAISTUMISAIKA

Seuraavan kaavan avulla, jota sovelletaan kontrolliastioita koskeviin tietoihin, voidaan määrittää versojen lukumäärän kaksinkertaistumisaika (T_d) ja varmistaa samalla, että testi täyttää tämän validiteettivaatimuksen (kohta 1.6):

$$T_d = \ln 2/\mu$$

Kaavassa μ on keskimääräinen spesifinen kasvunopeus, joka lasketaan kohdan 2.2.1 ensimmäisessä ja toisessa kappaleessa kuvatulla tavalla.

2.2 VASTEMUUTTUJAT

Testin tarkoituksena on määrittää testattavan aineen vaikutukset *Lemna*n kasvuun. Tässä testimenetelmässä kuvataan kahta eri vastemuuttujaa, koska jäsenvaltiot suosivat erilaisia käytänteitä ja asettavat erilaisia sääntelyvaatimuksia. Jotta testitulokset voitaisiin hyväksyä kaikissa jäsenvaltioissa, vaikutuksia olisi arvioitava käyttämällä molempia vastemuuttujia a ja b, joita kuvataan jäljempänä.

a) Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus: Tämä vastemuuttuja lasketaan kontrolleista ja kustakin käsitellystä ryhmästä seuraavien kahden muuttujan avulla: versojen lukumäärän logaritmiarvossa tietyn (päivinä ilmaistun) ajan kuluessa tapahtunut muutos ja jonkin toisen mittausmuuttujan (versojen kokonaispinta-alan, kuivapainon tai tuorepainon) logaritmiarvossa tietyn (päivinä ilmaistun) ajan kuluessa tapahtunut muutos. Tätä kasvunopeutta kutsutaan joskus suhteelliseksi kasvunopeudeksi (15).

b) Tuotos: Tämä vastemuuttuja lasketaan seuraavien kahden muuttujan avulla: versojen lukumäärän muutokset ja jonkin toisen mittausmuuttujan (versojen kokonaispinta-alan, kuivapainon tai tuorepainon) muutokset kontrolleissa ja kussakin käsitellyssä ryhmässä testin loppuun saakka.

On syytä huomata, että näiden kahden vastemuuttujan avulla lasketut myrkyllisyysarvot eivät ole vertailukelpoisia, mikä on otettava huomioon käytettäessä testin tuloksia. Jos testiolosuhteet ovat tämän testimenetelmän mukaiset, keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen perustuvat EC_x-arvot (E_rC_x) ovat yleensä suurempia kuin tuotokseen perustuvat arvot (E_yC_x), mikä johtuu niiden matemaattisista perusteista. Tätä ei pidä tulkita siten, että näiden kahden vastemuuttujan herkkyydet olisivat erilaiset, vaan arvojen välinen ero on puhtaasti matemaattinen. Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus perustuu yleiseen kasvumalliin, joka kuvaa limaskan eksponentiaalista kasvua rajoittamattomissa viljelmissä, joista toksisuus arvioidaan kasvunopeuteen kohdistuvien vaikutusten perusteella ottamatta huomioon kontrollin spesifisen kasvunopeuden absoluuttista tasoa, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuutta tai testin kestoa. Tuotosta kuvaavaan vastemuuttujaan perustuvat tulokset riippuvat sen sijaan kaikista näistä muista muuttujista. E_yC_x riippuu kussakin testissä käytetyn limaskalajin spesifisestä kasvunopeudesta ja suurimmasta spesifisestä kasvunopeudesta, joka voi vaihdella eri lajien ja jopa eri kloonien välillä. Tätä vastemuuttujaa ei saa käyttää vertailtaessa eri limaskalajien tai eri kloonienkaan herkkyyttä myrkyllisille aineille. Vaikka tieteen kannalta on parempi arvioida myrkyllisyyttä keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden perusteella, tähän testimenetelmään on otettu mukaan myös tuotokseen perustuvat myrkyllisyyden arvioinnit, jotta voidaan täyttää eräiden maiden nykyiset sääntelyvaatimukset.

▼M1

Myrkyllisyyden arviointien on perustuttava sekä versojen lukumäärään että johonkin toiseen mittausmuuttujaan (versojen kokonaispinta-alaan, kuivapainoon tai tuorepainoon), koska eräät aineet voivat vaikuttaa enemmän muihin mittausmuuttujiin kuin versojen lukumäärään. Tätä vaikutusta ei havaittaisi laskemalla pelkästään versojen lukumäärä.

Versojen lukumäärä ja muut kirjatut mittausmuuttujat (versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino tai tuorepaino) esitetään taulukkona, josta ilmenevät myös testiaineen pitoisuudet kussakin mittauksessa. Kun tietoja analysoidaan myöhemmin esimerkiksi LOEC-, NOEC- tai EC_x-pitoisuuden arvioimiseksi, analyysin perustana on käytettävä yksittäisistä toistoista saatuja arvoja eikä kunkin käsitellyn ryhmän laskettuja keskiarvoja.

2.2.1 **Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus**

Tietyn ajanjakson keskimääräinen spesifinen kasvunopeus lasketaan kasvumuuttujien – versojen lukumäärän ja jonkin toisen mittausmuuttujan (versojen kokonaispinta-alan, kuivapainon tai tuorepainon) – logaritmisena kasvuna soveltamalla seuraavaa kaavaa kaikkiin kontrolliliuosten ja käsiteltyjen liuosten toistoihin:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

jossa

— μ_{i-j} = keskimääräinen spesifinen kasvunopeus aikavälillä i–j

— N_i = testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä i

— N_j = testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä j

— t = aikaväli i–j.

Kullekin käsittely- ja kontrolliryhmälle lasketaan kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen.

Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus on laskettava koko testijaksolta (edellä olevassa kaavassa hetki ”i” tarkoittaa testin alkua ja hetki ”j” testin päättymistä). Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen. Sen lisäksi on määritettävä jaksoittaiset kasvunopeudet, jotta voidaan arvioida testiaineen vaikutuksia koko altistusaikana (esimerkiksi analysoimalla logaritmisia kasvukäyriä). Merkittävät erot jaksoittaisen kasvunopeuden ja keskimääräisen kasvunopeuden välillä osoittavat, että kasvu poikkeaa jatkuvasta eksponentiaalisesta kasvusta, jolloin kasvukäyriä on syytä tarkastella lähemmin. Siinä tapauksessa varovaisena lähestymistapana on verrata käsiteltyjen viljelmien spesifisiä kasvunopeuksia suurimman kasvunestymisen aikana kontrollien vastaaviin kasvunopeuksiin samana aikana.

▼M1

Kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen (I_r) voidaan sen jälkeen laskea kutakin testipitoisuutta varten (käsittelyryhmässä) seuraavan kaavan avulla:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

jossa

— $\%I_r$ = keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen

— μ_C = μ:n keskiarvo kontrolliryhmässä

— μ_T = μ:n keskiarvo käsittelyryhmässä.

2.2.2 **Tuotos**

Tuotokseen kohdistuvat vaikutukset määritetään seuraavien kahden mittausmuuttujan avulla: versojen lukumäärä ja jokin toinen mittausmuuttuja (versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino tai tuorepaino), joka mitataan jokaisesta koeastiasta testin alussa ja lopussa. Jos toisena mittausmuuttujana käytetään kuivapainoa tai tuorepainoa, testin alussa oleva biomassa määritetään samasta erästä otetun versonäytteen avulla, jota on käytetty koeastioiden siirrostamiseen (ks. kohdan 1.7.3 toinen kappale). Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan tuotoksen keskiarvo varianssiestimaatteineen. Tuotoksen prosentuaalinen estyminen (% I_y) voidaan laskea kutakin käsittelyryhmää varten seuraavasti:

$$\% I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

jossa

— % I_y = tuotoksen prosentuaalinen estyminen

— b_C = kontrolliryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa

— b_C = käsittelyryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa.

2.2.3 **Pitoisuus-vastekäyrien piirtäminen**

Pitoisuus-vastekäyrät piirretään merkitsemällä y-akselille vastemuuttujan keskimääräinen prosentuaalinen estyminen (vastemuuttujana on I_r tai I_y, joka lasketaan 2.2.1 kohdan viimeisen kappaleen tai 2.2.2 kohdan mukaan) ja x-akselille testiaineen pitoisuuden logaritmi.

2.2.4 **EC_x-pitoisuuden arviointi**

EC_x-pitoisuuden estimaattien (esimerkiksi EC_{50}-arvon) on perustuttava sekä keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen (E_rC_x) että tuotokseen (E_yC_x). Näistä kummankin on puolestaan perustuttava versojen lukumäärään ja johonkin toiseen mittausmuuttujaan (versojen kokonaispinta-alaan, kuivapainoon tai tuorepainoon), koska eräät testiaineet vaikuttavat eri tavalla versojen lukumäärään kuin muihin mittausmuuttujiin. Tavoitteena on siis saada myrkyllisyysparametreiksi seuraavat neljä EC_x-arvoa kutakin laskettua kasvunestymistasoa x kohden: E_rC_x (versojen lukumäärä); E_rC_x (versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino tai tuorepaino); E_yC_x (versojen lukumäärä) ja E_yC_x (versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino tai tuorepaino).

▼M1

2.3 TILASTOMENETELMÄT

Tavoitteena on saada kvantitatiivinen pitoisuus-vastesuhde regressioanalyysin avulla. Painotettua lineaarista regressiota voidaan käyttää sen jälkeen, kun vastetiedoille on tehty linearisoiva muunnos – esimerkiksi probitti-, logitti- tai Weibull-yksiköiksi (16) – mutta suositeltavampaa on käyttää epälineaarisia regressiomenetelmiä, joilla voidaan paremmin käsitellä tiedoissa väistämättä esiintyviä epäsäännöllisyyksiä sekä poikkeamia tasaisista jakaumista. Lähestyttäessä tilaa, jossa kasvu ei esty ollenkaan tai estyminen on täydellistä, linearisoiva muunnos voi suurentaa epäsäännöllisyyksiä ja haitata siten analyysiä (16). On syytä huomata, että standardianalyysimenetelmät, joissa käytetään probitti-, logitti- tai Weibull-muunnoksia, on tarkoitettu dikotomisia tietoja varten (kun vasteita on kaksi, esimerkiksi kuolleisuus tai eloonjääminen), minkä vuoksi niitä on mukautettava, jos niitä aiotaan käyttää kasvu- tai tuotostietojen analysointiin. Kirjallisuusviitteissä (17), (18) ja (19) kuvataan erityismenetelmiä, joilla EC_x-arvot voidaan määrittää jatkuvista tiedoista.

Kunkin vastemuuttujan analysoimiseksi käytetään pitoisuus-vastesuhdetta, jonka avulla lasketaan EC_x-arvojen piste-estimaatit. Jokaiselle estimaatille on määritettävä 95 prosentin luottamusväli, jos se on mahdollista. Vastetietojen ja regressiomallin välinen yhteensopivuuden aste on arvioitava joko graafisesti tai tilastollisesti. Regressionanalyysi on tehtävä käyttämällä yksittäisiä toistojen vasteita eikä käsittelyryhmien keskiarvoja.

EC_{50}-estimaatit ja luottamusvälit saadaan myös käyttämällä lineaarista interpolointia bootstrap-menetelmän kanssa (20), jos käytettävissä olevat regressiomallit tai -menetelmät eivät sovellu kyseisten tietojen käsittelyyn.

LOEC-pitoisuuden ja siten myös NOEC-pitoisuuden arvioimiseksi on verrattava käsiteltyjen liuosten keskiarvoja käyttämällä varianssianalyysitekniikoita (ANOVA). Sen jälkeen on verrattava kunkin pitoisuuden keskiarvoa kontrolliryhmän keskiarvoon käyttämällä sopivaa moniulotteista vertailumenetelmää tai trenditestimenetelmää. Dunnettin tai Williamsin testi voi olla käyttökelpoinen (21)(22)(23)-(24). Lisäksi on arvioitava, pitääkö ANOVA-oletus varianssin homogeenisuudesta paikkansa. Arviointi voidaan tehdä graafisesti tai virallisen testin avulla (25). Sopivia testejä ovat Levenen ja Bartlettin testit. Jos oletus varianssin homogeenisuudesta ei pidä paikkaansa, tilanne on joskus korjattavissa tietojen logaritmimuunnoksella. Jos varianssin heterogeenisuus on erittäin suuri eikä se ole korjattavissa muunnoksella, on harkittava analysointia sellaisilla menetelmillä kuin Jonckheeren alaspäin askeltava trenditesti. Kirjallisuusviitteessä (19) annetaan lisäohjeita NOEC-arvon määrittämisestä.

Tieteen viimeaikaisen kehityksen perusteella on suositeltu, että NOEC-käsitteestä luovuttaisiin ja se korvattaisiin regressioanalyysiin perustuvilla EC_x:n piste-estimaateilla. Sopivaa x:n arvoa ei ole vielä vahvistettu tätä *Lemna*-testiä varten. Sopivalta vaikuttaisi väli 10–20 prosenttia (valitun vastemuuttujan mukaan), ja on suositeltavaa ilmoittaa sekä EC_{10}- että EC_{20}-arvo.

3. RAPORTOINTI

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, mukaan luettuna vesiliukoisuuden raja-arvo,

▼M1

— kemialliset tunnistetiedot (esimerkiksi CAS-numero), mukaan luettuna puhtaus.

Koelajit:

— tieteellinen nimi, klooni (jos tiedossa) ja alkuperä.

Testiolosuhteet:

— testauksessa käytetty menetelmä (staattinen, semistaattinen tai läpivirtausmenetelmä),

— testin alkamispäivä ja kesto,

— testiviljelyaine,

— koejärjestely: koeastiat ja niiden sulkimet, liuostilavuudet, kolonioiden ja versojen lukumäärä koeastiaa kohden testin alussa,

— testipitoisuudet (nimellis- ja mitatut pitoisuudet tapauksen mukaan) sekä toistojen määrä pitoisuutta kohden,

— kanta- ja testiliuosten valmistusmenetelmät, mukaan luettuina tiedot mahdollisesta liuottimen tai dispergointiaineen käytöstä,

— lämpötila testin aikana,

— valolähde, valon voimakkuus ja homogeenisuus,

— testi- ja kontrolliviljelyaineen pH-arvot,

— testiaineen pitoisuudet ja analyysimenetelmä sekä laadunarviointiin tarvittavat tiedot (validointitutkimukset, analyysien keskihajonnat ja luottamusvälit),

— versojen lukumäärän ja muiden mittausmuuttujien, kuten kuivapainon, tuorepainon tai versojen kokonaispinta-alan, määritysmenetelmät,

— kaikki poikkeamat tästä testimenetelmästä.

Tulokset:

— raakatiedot: versojen lukumäärä ja muut mittausmuuttujat jokaisessa testaukseen ja toistoihin käytetyssä koeastiassa kullakin havainnointi- ja analysointikerralla,

— kunkin mittausmuuttujan keskiarvot ja keskihajonnat,

— kutakin pitoisuutta vastaavat kasvukäyrät (suosituksena on käyttää mittausmuuttujan logaritmimuunnosta, ks. 2.2.1 kohdan toinen kappale),

— kaksinkertaistumisaika/kasvunopeus kontrollissa versojen lukumäärän avulla laskettuna,

— kunkin käsitellyn toiston lasketut vastemuuttujat sekä toistojen keskiarvot ja variaatiokerroin,

— pitoisuuden ja vaikutuksen välisen suhteen graafinen esitys,

— myrkyllisyysarvioinnin päätepisteiden estimaatit vastemuuttujien osalta, esimerkiksi EC_{50}, EC_{10} ja EC_{20}, ja vastaavat luottamusvälit; LOEC- ja/tai NOEC-pitoisuus, jos ne on laskettu, ja niiden määrityksessä käytetyt tilastomenetelmät,

▼M1

— jos on käytetty ANOVA-analyysiä, havaittavissa olevan vaikutuksen suuruus (esimerkiksi vähiten merkitsevä erotus),

— mahdollinen kasvun edistyminen käsittelyissä liuoksissa,

— näkyvät merkit fytotoksisuudesta ja testiliuoksia koskevat havainnot,

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

4. **KIRJALLISUUS**

(1) OECD TG 221 (2006) *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test.

(2) The use of *Lemna* studies for coloured substances is detailed in Section 13.5.3 of the EU Manual of Decisions dated July 2006, at http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals.

(3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment – Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, available at

http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/-information_requirements_en.htm?time=1234958685#A.

(4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (hyväksytty uudelleen vuonna 1998). s. 733–742. Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(5) USEPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8 s.

(6) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 s.

(7) SIS – Svenska standardiseringsinstitutet (1995). Vattenundersökningar – Bestämning av tillväxthämning (7 dygn) hos flytbladsväxten *Lemna minor*, andmat. SS 02 82 13. 15 s.

(8) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37–120 s.

(9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

(11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(12) ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.

▼**M1**

(13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. Syyskuu 1977.

(14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, s. 353–359.

(15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, s. 481–483.

(16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, s. 713–718.

(17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, s. 157–167.

(18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, s. 1485–1494.

(19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(20) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USEPA, Duluth, MN.

(21) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, s. 1096–1121.

(22) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, s. 482–491.

(23) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

(24) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

(25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, s. 93–96.

▼M1

Lisäys 1

***Lemna* spp:n kuvaus**

Limaskaksi yleisesti kutsuttu vesikasvi *Lemna* spp. kuuluu *Lemnaceae*-heimoon. Siihen kuuluu neljä sukua, joiden lajeja esiintyy kaikkialla maailmassa. Niiden erilaisia ulkomuotoja ja taksonomiaa on käsitelty perusteellisesti kirjallisuusviitteissä (1)(2). *Lemna gibba* ja *Lemna minor* ovat lauhkean vyöhykkeen alueille luonteenomaisia lajeja. Niitä käytetään yleisesti myrkyllisyystesteissä. Molemmilla lajeilla on kelluva tai vedenalainen levymäinen verso, ja kunkin verson alapinnan keskiosasta lähtee hyvin ohut juuri. *Lemna* spp. kukkii hyvin harvoin ja lisääntyy kasvullisesti tuottamalla uusia versoja (3). Nuoremmat kasvit ovat vanhempiin kasveihin verrattuna yleensä vaaleampia, niillä on lyhyemmät juuret ja niissä on kaksi tai kolme erikokoista versoa. *Lemna*-suvun kasvit sopivat erittäin hyvin laboratoriokokeisiin pienen kokonsa, yksinkertaisen rakenteensa, suvuttoman lisääntymisensä ja lyhyen generaatioaikansa ansiosta (4)(5).

Koska kasvien herkkyys luultavasti vaihtelee lajista toiseen, herkkyyttä vertailtaessa hyväksytään ainoastaan lajin sisäiset vertailut.

Kirjallisuutta: esimerkkejä testauksessa käytetyistä *Lemna*-lajeista:

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935–941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., ”Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8 s.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 s.

SIS – Svenska standardiseringsinstitutet (1995). Vattenundersökningar – Bestämning av tillväxthämning (7 dygn) hos flytbladsväxten *Lemna minor*, andmat. SS 02 82 13. 15 s.

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (hyväksytty uudelleen vuonna 1998). S. 733–742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., ”Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8 s.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959–1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87–96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481–483.

▼M1

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102–2111.

Lemna-lajien hankintalähteitä

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Puhelin: +1-416-978-3641
Faksi:+1-416-978-5878
Sähköposti: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
United States
Puhelin: 001 (919) 515-7572
Sähköposti: astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91 Stockholm
Sweden
Puhelin: +46 8 674 7240
Faksi: +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Germany
Sähköposti: lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Kirjallisuus

(1) Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221–287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1–14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7–22.

▼**M1**

Lisäys 2

Kantaviljelmän ylläpito

Kantaviljelmiä voidaan säilyttää alhaisissa lämpötiloissa (4–10 °C) suhteellisen pitkiä aikoja käynnistämättä niitä uudelleen. *Lemna*-kasvien viljelyaine voi olla sama kuin testauksessa käytetty viljelyaine, mutta kantaviljelmissä voidaan käyttää myös muita ravinteikkaita viljelyaineita.

Joukko nuoria, vaaleanvihreitä kasveja siirretään säännöllisesti aseptisella menetelmällä uusiin, tuoretta viljelyainetta sisältäviin viljelyastioihin. Jatkoviljelmiä voidaan käynnistää jopa kolmen kuukauden väliajoin tässä liitteessä ehdotetuissa viileissä olosuhteissa.

Kasveja viljeltäessä on käytettävä kemiallisesti puhtaita (happopestyjä) ja steriilejä lasisia kasvatusastioita sekä aseptisia käsittelytekniikoita. Jos esimerkiksi levät tai sienet kontaminoivat kantaviljelmän, on ryhdyttävä toimiin näiden eliöiden poistamiseksi. Levät ja useimmat muut kontaminoivat eliöt voidaan poistaa pintasteriloinnilla. Kontaminoituneesta kasvimateriaalista otetaan näyte, ja juuret leikataan pois. Materiaalia ravistellaan puhtaassa vedessä voimakkaasti, minkä jälkeen se upotetaan 0,5 tilavuusprosentin natriumhypokloriittiliuokseen, jossa sitä pidetään 30 sekunnista 5 minuuttiin. Sen jälkeen kasvimateriaali huuhdellaan steriilillä vedellä ja siirretään erinä tuoretta viljelyainetta sisältäviin kasvatusastioihin. Monet versot kuolevat tämän käsittelyn jälkeen varsinkin, jos altistusajat ovat pitkiä, mutta osa eloon jäävistä versoista on yleensä vapautunut kontaminaatiosta. Näitä versoja voidaan käyttää uusien viljelmien siirrostamiseen.

▼M1

Lisäys 3

Viljelyaine

L. minor- ja *L. gibba* -lajin viljelyyn suositellaan eri viljelyaineita. *L. minor* -lajin viljelyyn suositellaan ruotsalaisen standardin (SIS) mukaisen viljelyaineen muunnosta, kun taas *L. gibba* -lajin viljelyyn suositellaan 20X-AAP-viljelyainetta. Kummankin viljelyaineen koostumus esitetään jäljempänä. Näitä viljelyaineita valmistettaessa on käytettävä reagenssi- tai analyysilaatua olevia kemikaaleja ja deionisoitua vettä.

Ruotsalaisen standardin (SIS) mukainen viljelyaine Lemnan viljelyä varten

— Kantaliuokset I–V steriloidaan autoklaavikäsittelyllä (120 °C, 15 minuuttia) tai kalvosuodatuksella (huokoskoko noin 0,2 μm).

— Kantaliuos VI (ja valinnaisesti kantaliuos VII) voidaan steriloida vain kalvosuodatuksella; näitä liuoksia ei saa autoklavoida.

— Steriilejä kantaliuoksia säilytetään viileässä ja pimeässä. Kantaliuokset I–V on heitettävä pois kuuden kuukauden kuluttua. Kantaliuosta VI (ja valinnaista kantaliuosta VII) voidaan säilyttää yhden kuukauden ajan.

Kantaliuoksen numero	Aine	Pitoisuus kantaliuoksessa ($g \cdot l^{-1}$)	Pitoisuus valmistetussa viljelyaineessa ($mg \cdot l^{-1}$)	Valmistettu viljelyaine	
				Alkuaine	Pitoisuus ($mg \cdot l^{-1}$)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA·$2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (puskuri)	490	490	—	—

— Yksi litra SIS-viljelyainetta valmistetaan lisäämällä seuraavat aineet 900 ml:aan deionisoitua vettä:

— 10 ml kantaliuosta I

— 5 ml kantaliuosta II

— 5 ml kantaliuosta III

— 5 ml kantaliuosta IV

▼M1

— 1 ml kantaliuosta V

— 5 ml kantaliuosta VI

— 1 ml kantaliuosta VII (valinnaisesti).

Huomautus: Eräitä testiaineita varten voidaan tarvita ylimääräistä kantaliuosta VII (MOPS-puskuria) (ks. 1.4 kohdan viimeinen kappale).

— Viljelyaineen pH säädetään arvoon 6,5 ± 0,2 käyttämällä 0,1 tai 1 mol HCl:a tai NaOH:a, minkä jälkeen lisätään deionisoitua vettä, kunnes tilavuus on yksi litra.

20X-AAP-viljelyaine

Kantaliuokset valmistetaan steriiliin tislattuun tai deionisoituun veteen.

Steriilejä kantaliuoksia säilytetään viileässä ja pimeässä. Tällaisissa olosuhteissa kantaliuokset säilyvät ainakin 6–8 viikkoa.

20X-AAP-viljelyainetta varten valmistetaan viisi ravinnepitoista kantaliuosta (A1, A2, A3, B ja C) käyttämällä reagenssilaatua olevia kemikaaleja. Viljelyaineen valmistamiseksi lisätään 20 ml kutakin ravinnepitoista kantaliuosta noin 850 ml:aan deionisoitua vettä. Viljelyaineen pH säädetään arvoon 7,5 ± 0,1 käyttämällä 0,1 tai 1 mol HCl:a tai NaOH:a, minkä jälkeen lisätään deionisoitua vettä, kunnes tilavuus on yksi litra. Sen jälkeen viljelyaine suodatetaan steriiliin astiaan kalvosuodattimen läpi, jonka huokoskoko on noin 0,2 μm.

Testauksessa käytettävä viljelyaine on valmistettava 1–2 päivää ennen käyttöä, jotta pH stabiloituisi. Viljelyaineen pH on tarkistettava ennen käyttöä ja tarvittaessa säädettävä uudelleen lisäämällä 0,1 tai 1 M NaOH:a tai HCl:a, kuten edellä on kuvattu.

Kantaliuoksen numero	Aine	Pitoisuus kantaliuoksessa ($g \cdot l^{-1}$) (1)	Pitoisuus valmistetussa viljelyaineessa ($mg \cdot l^{-1}$) - (*)	Valmistettu viljelyaine	
				Alkuaine	Pitoisuus ($mg \cdot l^{-1}$) - (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 $mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Jollei toisin ilmoiteta.

▼**M1**

Alaviite: Teoreettisesti sopiva lopullinen bikarbonaattipitoisuus (jossa pH:ta ei tarvitse säätää kovin paljon) on 15 mg/l (ei siis 300 mg/l). 20X-AAP-viljelyaineen aiemmassa käytössä, muun muassa tätä testimenetelmää koskevassa yhteistutkimuksessa, bikarbonaattipitoisuus on kuitenkin ollut 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

Steinbergin viljelyaine (ISO 20079 -standardin mukaan)

Pitoisuudet ja kantaliuokset

— Muutettua Steinbergin viljelyainetta käytetään ISO 20079 -standardissa ainoastaan *Lemna minor* -lajin viljelyyn (koska standardissa ei sallita muita lajeja), mutta testit ovat osoittaneet, että sillä voidaan saada hyviä tuloksia myös *Lemna gibba* -lajin viljelyssä.

— Viljelyainetta valmistettaessa on käytettävä reagenssi- tai analyysilaatua olevia kemikaaleja ja deionisoitua vettä.

— Ravinneliuos valmistetaan kantaliuoksesta tai 10 kertaa väkevämmästä viljelyaineesta, jolloin liuoksen pitoisuus saadaan mahdollisimman suureksi ilman saostumista.

Taulukko 1

pH-stabiloitu Steinbergin viljelyaine (muutettu Altenburgerin mukaan)

Aine		Ravinneliuos	
Makroravinteet	moolipaino	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Mikroravinteet	moolipaino	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA-dinatriumdihydraatti	372,24	1 500,00	4,03

▼**M1**

Taulukko 2

Kantaliuokset (makroravinteet)

1. **Makroravinteet (50-kertainen väkevöinti)**	g/l
Kantaliuos 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Kantaliuos 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Kantaliuos 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Taulukko 3

Kantaliuokset (mikroravinteet)

2. **Mikroravinteet (1 000-kertainen väkevöinti)**	mg/l
Kantaliuos 4:	
H_3BO_3	120,0
Kantaliuos 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Kantaliuos 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Kantaliuos 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Kantaliuos 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA-dinatriumdihydraatti	1 500,00

— Kantaliuokset 2 ja 3 voidaan yhdistää, samoin kuin kantaliuokset 4–7 (ottaen samalla huomioon vaaditut pitoisuudet).

— Jotta kantaliuokset säilyisivät pitempään, ne voidaan autoklavoida 121 °C:ssa 20 minuutin ajan tai niille voidaan tehdä steriili suodatus (huokoskoko 0,2 μm). Kantaliuoksen 8 steriili suodatus (huokoskoko 0,2 μm) on erittäin suositeltavaa.

Steinbergin (muutetun) viljelyaineen lopullisen pitoisuuden valmistaminen

— Lisätään 20 ml kantaliuoksia 1, 2 ja 3 (ks. taulukko 2) noin 900 ml:aan deionisoitua vettä saostumisen ehkäisemiseksi.

— Lisätään 1,0 ml kantaliuoksia 4, 5, 6, 7 ja 8 (ks. taulukko 3).

— Liuoksen pH:n on oltava 5,5 ± 0,2 (säädetään lisäämällä mahdollisimman vähän NaOH-liuosta tai HCl:a).

▼M1

— Lisätään vettä, kunnes tilavuus on 1 000 ml.

— Jos kantaliuokset on steriloitu ja niihin on käytetty sopivaa vettä, uutta sterilointia ei tarvita. Jos lopullinen viljelyaine steriloidaan, autoklaavikäsittelyn jälkeen (20 minuuttia 121 °C:ssa) on lisättävä kantaliuosta 8.

Steinbergin (muutetun) viljelyaineen kymmenkertainen väkevöinti väliaikaista varastointia varten

— Lisätään 20 ml kantaliuoksia 1, 2 ja 3 (ks. taulukko 2) noin 30 ml:aan vettä saostumisen ehkäisemiseksi.

— Lisätään 1,0 ml kantaliuoksia 4, 5, 6, 7 ja 8 (ks. taulukko 3). Lisätään vettä, kunnes tilavuus on 100 ml.

— Jos kantaliuokset on steriloitu ja niihin on käytetty sopivaa vettä, uutta sterilointia ei tarvita. Jos lopullinen viljelyaine steriloidaan, autoklaavikäsittelyn jälkeen (20 minuuttia 121 °C:ssa) on lisättävä kantaliuosta 8.

— Viljelyaineen pH:n on (lopullisessa pitoisuudessa) oltava 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 MYRKYLLISYYSTESTI CHIRONOMID-ELIÖLLÄ VESI-SEDIMENTTISYSTEEMISSÄ KÄYTTÄEN SEDIMENTTIÄ, JOHON TUTKITTAVAA AINETTA ON LISÄTTY

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 218 (2004). Tällä testimenetelmällä on tarkoitus arvioida pitkäaikaisen kemikaalialtistuksen vaikutuksia makean veden kaksisiipisen *Chironomus*-lajin (surviaissääsken) toukkiin, jotka elävät sedimentissä. Menetelmä perustuu *Chironomus riparius*- ja *Chironomus tentans* -toksisuustestimenettelyihin, jotka on kehitetty Euroopassa (1)(2)(3) ja Pohjois-Amerikassa (4)(5)(6)(7)(8) ja vahvistettu yhteistutkimuksissa (ring-test) (1)(6)(9). Myös muita hyvin dokumentoituja chironomid-lajeja, kuten *Chironomus yoshimatsui* (10)(11), voidaan käyttää.

2. Tässä testimenetelmässä altistus tapahtuu lisäämällä sedimenttiin testiainetta. Soveltuvan altistuksen valinta määräytyy testin sovellustarkoituksen mukaan. Testiaineen lisäämisellä sedimenttiin on tarkoitus simuloida kemikaalin pysyvää kertymää sedimenttiin. Tässä altistusjärjestelmässä tutkittavaa ainetta lisätään vesi-sedimenttisysteemin sedimenttiin.

3. Aineet, joita sedimentissä elävillä eliöillä testataan, säilyvät yleensä sedimentissä pitkään. Sedimentissä elävien eliöiden altistamiseen voidaan käyttää useita reittejä. Jokaisen altistusreitin suhteellinen tärkeys sekä toksiseen kokonaisvaikutukseen vaadittava aika määräytyvät käytettävän kemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva aine (esim. log K_{ow} > 5) tai aine, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, kontaminoituneen ravinnon nauttiminen voi olla tärkeä altistusreitti. Jotta hyvin rasvahakuisten aineiden myrkyllisyyttä ei aliarvioida, voidaan harkita ravinnon lisäämistä sedimenttiin ennen testiaineen lisäämistä. Jotta kaikki mahdolliset altistusreitit voidaan huomioida, tämä testimenetelmä keskittyy pitkäaikaiseen altistukseen. Testin kesto on 20–28 päivää *C. riparius*- ja *C. yoshimatsui* -lajeille ja 28–65 päivää *C. tentans* -lajille. Jos lyhytaikaisia tietoja tarvitaan tiettyyn tarkoitukseen, kuten epävakaan kemikaalin vaikutusten tutkimiseen, ylimääräiset rinnakkaisnäytteet voidaan poistaa 10 päivän jälkeen.

4. Mitatut tutkittavat ominaisuudet ovat kuoriutuneiden täysikasvuisten kokonaismäärä ja kuoriutumiseen kulunut aika. Jos lyhytaikaiset lisätiedot ovat tarpeen, toukkien eloonjäämistä ja kasvua on suositeltavaa mitata vasta kymmenen päivän kuluttua käyttämällä ylimääräisiä rinnakkaisnäytteitä.

5. Synteettisen sedimentin käyttö on suositeltavaa. Synteettisellä sedimentillä on useita etuja luonnolliseen sedimenttiin verrattuna:

   — kokeellinen vaihtelu vähenee, koska sedimentti on toistettava ”vakiomatriisi”, eikä kontaminoitumattomia ja puhtaita sedimenttilähteitä tarvitse etsiä

   — testit voidaan aloittaa milloin tahansa ilman, että testisedimentin kausivaihtelua esiintyy, sedimentistä ei tarvitse poistaa alkuperäiselimistöä esikäsittelyllä ja lisäksi synteettisen sedimentin käyttö pienentää kuluja, joita rutiinitestaukseen tarvittavan sedimenttimäärän keräämisestä kentältä syntyy

   — synteettisen sedimentin käyttö sallii toksisuuden vertailun ja aineiden lajittelemisen myrkyllisyyden mukaan.

6. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

▼M4

TESTIN PERIAATE

7. Surviaissääsken munatoukat altistetaan testikemikaalin pitoisuusalueelle vesi-sedimenttisysteemeissä. Testiainetta lisätään sedimenttiin, ja munatoukat siirretään dekantterilaseihin, joissa sedimentin ja veden pitoisuudet on stabiloitu. Surviaissääskien kuoriutumisaste ja kehittymisnopeus mitataan testin lopussa. Toukkien eloonjäänti ja paino voidaan myös tarvittaessa mitata 10 päivän kuluttua (käytättämällä soveltuvia ylimääräisiä rinnakkaisnäytteitä). Nämä tiedot analysoidaan regressiomallilla, jolla arvioidaan pitoisuus, joka aiheuttaa X prosentin laskun kuoriutumisessa tai toukkien eloonjäännissä tai painossa (esim. EC_{15}, EC_{50}), tai tilastollisen hypoteesin testillä, jolla määritetään NOEC/LOEC. Jälkimmäinen vaihtoehto edellyttää vaikutusarvojen vertaamista vertailuarvoihin tilastotutkimuksilla.

TESTIAINETTA KOSKEVIA TIETOJA

8. Testiaineen vesiliukoisuuden, höyrynpaineen, mitatun tai lasketun erottumisen erottuminen sedimenttiin sekä stabiiliuden vedessä ja sedimentissä on oltava tiedossa. Käytössä on oltava luotettava analyysimenetelmä, jolla testiaine voidaan kvantifioida sedimentin päällä olevassa vedessä, huokosvedessä ja sedimentissä, ja menetelmän tarkkuus ja havaitsemisraja tunnetaan ja ne on raportoitu. Hyödyllisiä tietoja ovat esimerkiksi rakennekaava ja testiaineen puhtaus. Myös testiaineen kemiallinen kohtalo (esim. häviäminen, abioottinen ja bioottinen hajoaminen) on hyödyllistä tietää. Kirjallisuusviitteessä (12) annetaan lisäohjeita sellaisten aineiden testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

VERTAILUKEMIKAALIT

9. Testimenettelyn ja testiolosuhteiden luotettavuus voidaan tarkistaa testaamalla ajoittain vertailukemikaaleja. Esimerkkejä vertailumyrkyistä, joita on käytetty onnistuneesti yhteistutkimuksissa ja validointitutkimuksissa: lindaani, trifluraliini, pentakloorifenoli, kadmiumkloridi ja kaliumkloridi (1)(2)(5)(6)(13).

TESTIN LUOTETTAVUUS

10. Testi on luotettava, jos

— kuoriutuvuus kontrolleissa on vähintään 70 prosenttia testin lopussa (1)(6)

— *C. riparius* ja *C. yoshimatsui* aikuistuvat kontrolliastioissa 12–23 päivän kuluessa astiaan laittamisesta. *C. tentans* vaatii 20–65 päivää

— testin lopussa mitataan jokaisen astian pH ja liuenneen hapen pitoisuus. Happipitoisuuden täytyy olla vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta (ASV) käytetyssä lämpötilassa, ja sedimentin päällä olevan veden pH-arvon pitää olla 6–9 kaikissa testiastioissa

— veden lämpötila vaihtelee enintään ± 1,0 °C. Veden lämpötilaa voidaan kontrolloida tasalämpöisessä huoneessa, jolloin huoneen lämpötila on tarkistettava soveliain väliajoin.

▼M4

MENETELMÄN KUVAUS

Testiastiat

11. Tutkimus tehdään 600 ml:n dekantterilaseissa, joiden halkaisija on 8 cm. Muitakin astioita voidaan käyttää, kunhan sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys on sopiva. Sedimentin pinta-alan on oltava riittävä, jotta tilaa on 2–3 cm^2 toukkaa kohden. Sedimenttikerroksen ja sen päällä olevan veden syvyyden suhteen on oltava 1:4. Testiastioiden ja muiden testijärjestelmän kanssa kosketuksissa olevien välineiden on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia (esim. teflonia).

Lajin valinta

12. Paras laji tähän testiin on *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* soveltuu myös, mutta sen käsittely on hankalampaa ja se edellyttää pidempää testijaksoa. Myös *Chironomus yohimatsui* -lajia voidaan käyttää. Tietoa *Chironomus riparius* -lajin kasvatusmenetelmistä on lisäyksessä 2. Myös muiden lajien kasvatusolosuhteista on saatavissa tietoa: *Chironomus tentans* (4) and *Chironomus yoshimatsui* (11). Lajin tunnistus on varmistettava ennen testiä, mutta sitä ei ole tarpeen tehdä ennen joka testiä, jos eliöt ovat peräisin omasta kasvattamosta.

Sedimentti

13. Synteettisen sedimentin (keinosedimentin) käyttö on suositeltavaa. Jos kuitenkin käytetään luonnollista sedimenttiä, se on kuvailtava (vähintään pH, orgaaninen kokonaishiilipitoisuus, mutta myös muut parametrit, kuten C/N-suhde ja rakeisuus ovat suositeltavia), eikä siinä saa olla kontaminaatiota tai muita organismeja, jotka saattavat kilpailla chironomid-eliöiden kanssa tai syödä ne. Lisäksi on suositeltavaa, että luonnollista sedimenttiä sopeutetaan ennen chironomid-eliöillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat. Tätä testiä varten suositellaan seuraavaa synteettistä sedimenttiä, joka perustuu testimenetelmässä C.8 (14) käytettyyn keinomaahan (1)(15)(16):

a) 4–5 % (kuivapaino) turvetta: pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0; on tärkeää käyttää ainoastaan ilmakuivattua jauhemaista turvetta, joka on jauhettu hienoksi (hiukkaskoko ≤ 1 mm)

b) 20 % (kuivapaino) kaoliniittisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 %)

c) 75–76 % (kuivapaino) kvartsihiekkaa (pääosin hienoa hiekkaa, yli 50 prosenttia 50–200 μm:n hiukkasia)

d) deionisoitua vettä lisätään, kunnes lopullisen seoksen kosteus on 30-50 %

e) kemiallisesti puhdasta kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$) lisätään, jotta lopullisen sedimenttiseoksen pH-arvoksi tulee 7,0 ± 0,5 orgaanisen hiilen pitoisuuden on oltava lopullisessa seoksessa 2 % (± 0,5 %). Sitä voidaan säätää lisäämällä sopiva määrä turvetta ja hiekkaa kohtien a) ja c) mukaisesti.

14. Turpeen, kaoliniittisaven ja hiekan alkuperän on oltava tiedossa. Tarkista, ettei sedimentin ainesosissa ole kemikaalista kontaminaatiota (esim. raskasmetalleja, orgaanisia klooriyhdisteitä ja orgaanisia fosforiyhdisteitä). Esimerkki synteettisen sedimentin valmistuksesta on lisäyksessä 3. Myös kuivien ainesosien sekoittaminen on hyväksyttävää, jos voidaan osoittaa, että sedimentin ainesosat eivät erotu (esim. kelluvia turvehiukkasia) veden lisäämisen jälkeen ja että turve tai sedimentti on sopeutunut tarpeeksi.

▼M4

Vesi

15. Testivedeksi soveltuu vesi, joka täyttää lisäyksissä 2 ja 4 luetellut laimennusveden kemialliset ominaisuudet. Kasvatus- ja testivedeksi soveltuu mikä tahansa vesi, luonnonvesi (pinta- tai pohjavesi), synteettinen vesi (katso lisäys 2) tai talousvesi, josta on poistettu kloori, jos surviaissääsket voivat elää siinä viljelyn ja testauksen ajan osoittamatta stressaantumisen merkkejä. Testiveden pH-arvon on oltava testin alussa 6–9, eikä kokonaiskovuus $CaCO_3$:na saa olla yli 400 mg/l. Jos kovuusionien ja testiaineen välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä). Samantyyppistä vettä on käytettävä koko tutkimuksen ajan. Lisäyksessä 4 luetellut vedenlaadun ominaisuudet on mitattava vähintään kahdesti vuodessa tai aina kun on epäilystä siitä, että nämä ominaisuudet ovat voineet muuttua merkittävästi.

Kantaliuokset – sedimentit, joihin on lisätty testiainetta

16. Sedimentit, joiden pitoisuus on haluttu, valmistetaan yleensä lisäämällä testiaineliuosta suoraan sedimenttiin. Testiaineen kantaliuos, joka on liuotettu deionisoituun veteen, sekoitetaan synteettiseen sedimenttiin valssauskoneella, sekoittimella tai käsin. Jos testiaine liukenee huonosti veteen, se voidaan liuottaa käyttämällä pienintä mahdollista määrää soveltuvaa orgaanista liuotinta (esim. heksaania, asetonia tai kloroformia). Seuraavaksi liuokseen sekoitetaan 10 g hienoa kvartsihiekkaa yhtä testiastiaa kohden. Sen jälkeen liuottimen annetaan haihtua. Sitä ei saa jäädä hiekkaan yhtään. Seuraavaksi hiekkaan sekoitetaan sopiva määrä sedimenttiä jokaista dekantterilasia varten. Testiaineen liuottamiseen, dispergoimiseen tai emulgointiin saa käyttää vain helposti haihtuvia aineita. On pidettävä mielessä, että testiaineen ja hiekkaseoksen mukana tuleva hiekka on otettava huomioon sedimentin valmistuksessa (eli sedimentin valmistukseen on käytettävä pienempi määrä hiekkaa). Varmista huolellisesti, että sedimenttiin lisättävä testiaine sekoittuu sedimenttiin hyvin ja tasaisesti. Homogeenisuusasteen voi määrittää tarvittaessa analysoimalla osanäytteitä.

TESTISUUNNITELMA

17. ”Testisuunnitelma” tarkoittaa testipitoisuuksien lukumäärän ja pitoisuusvälien valintaa, astioiden lukumäärää kutakin pitoisuutta kohti ja toukkien lukumäärää astiaa kohti. Suunnitelmat EC-pisteen arviointia, NOEC:n määritystä ja rajatestin tekemistä varten on kuvattu.

Regressioanalyysille suositeltava testisuunnitelma

18. Testissä käytettävien pitoisuuksien on katettava vaikutuspitoisuus (esim. EC_{15}, EC_{50}) ja se pitoisuusalue, joka on merkityksellinen kyseisen testiaineen kannalta.Tarkkuus ja etenkin luotettavuus, jolla vaikutuspitoisuuksien (EC_x) estimaatit voidaan tehdä, paranee yleensä, kun vaikutuspitoisuus sijoittuu testattujen pitoisuuksien alueelle. Ekstrapolointia paljon matalimman positiivisen pitoisuuden alle tai korkeimman pitoisuuden ylle on vältettävä. Alustava pitoisuusalueen määrittely voi auttaa sopivien testipitoisuuksien valinnassa (katso kohta 27).

▼M4

19. Jos halutaan arvioida EC_x, jokaisesta pitoisuudesta tarvitaan vähintään viisi testipitoisuutta ja kolme rinnakkaisnäytettä. On joka tapauksessa suositeltavaa käyttää riittäviä testipitoisuuksia, jotta mallin estimointi onnistuu hyvin. Pitoisuuksien välinen kerroin ei saa olla yli kaksi (poikkeus voidaan tehdä, jos annosvastekäyrä on loiva). Käsittelyssä käytettävien toistojen määrää voidaan laskea, jos eri vasteita aiheuttavien testipitoisuuksien määrää nostetaan. Jos toistojen määrää lisätään tai testipitoisuuden välejä pienennetään, testin luottamusväli yleensä kapenee. Toistoja tarvitaan lisää, jos halutaan arvioida toukkien eloonjäänti ja kasvu 10 päivän aikana.

NOEC:n/LOEC:n estimointiin suositeltava testisuunnitelma

20. Jos halutaan arvioida LOEC tai NOEC, on käytettävä vähintään viittä testipitoisuutta ja vähintään neljää rinnakkaisnäytettä, eikä pitoisuuksien välinen kerroin saa olla yli kaksi. Rinnakkaisnäytteiden määrän on oltava riittävän suuri, jotta tilastollinen voima on riittävä ja kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla ($p = 0,05$). Kehittymisnopeuteen soveltuu yleensä varianssianalyysi (ANOVA), kuten Dunnett-testi ja Williams-testi (17)(18)(19)(20). Kuoriutumisasteeseen voidaan käyttää Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferronin korjauksella) tai Mantel-Haenszelin testiä.

Rajatesti

21. Rajatesti (yksi testipitoisuus ja kontrolli) voidaan tehdä, jos alustavassa pitoisuusalueen määrityksessä ei havaittu vaikutuksia. Rajatestin tarkoituksena on tehdä testi riittävän suurella pitoisuudella, jotta päättäjät voivat sulkea pois testiaineen mahdolliset toksiset vaikutukset, ja raja asetetaan pitoisuuteen, jota ei odoteta esiintyvän missään tilanteessa. Suositeltava arvo on 1 000 mg/kg (kuivapaino). Yleensä vähintään kuusi rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä on tarpeen. On osoitettava, että tilastollinen voima on riittävä, jotta kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla ($p = 0,05$). Jos vaste on metrinen (kehittymisnopeus ja paino), t-testi on soveltuva tilastollinen menetelmä, jos tiedot täyttävät tämän testin vaatimukset (normaalisuus, homogeeniset vaihtelut). Jos vaatimukset eivät täyty, voidaan käyttää t-testiä, jossa varianssit ovat heterogeenisia, tai parametritonta testiä, kuten Wilcoxon-Mann-Whitheyn testiä. Fisherin tarkka testi soveltuu kuoriutumisasteeseen.

MENETTELY

Altistumisolosuhteet

Vesi-sedimenttisysteemin valmistelu käyttäen sedimenttiä, johon tutkittavaa ainetta on lisätty

22. Testimenetelmässä C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla kuvattu lisäysmenetelmä on suositeltava tapa lisätä testiainetta (14). Sedimentit, joihin testiaine on lisätty, asetetaan astioihin ja niiden päälle lisätään vettä, kunnes sedimentin ja veden tilavuussuhde on 1:4 (katso kohdat 11 ja 15). Sedimenttikerroksen syvyyden on oltava 1,5–3 cm. Sedimentin voi peittää muovikiekolla, kun testivettä lisätään vesipatsaaseen, jotta sedimentin ainesosien erottuminen ja hienon materiaalin resuspensio voidaan välttää, mutta kiekko on poistettava heti tämän jälkeen. Myös muut välineet voivat olla sopivia.

23. Testiastiat on peitettävä (esim. lasilevyillä). Jos vettä haihtuu tutkimuksen aikana, lisää vettä, kunnes veden tilavuus on alkuperäisellä tasolla. Käytä tähän tarkoitukseen tislattua tai deionisoitua vettä, jotta suoloja ei keräydy.

▼M4

Stabilointi

24. Kun sedimenttiin on lisätty testiaine ja sedimentin yläpuolelle on lisätty vesi, testiaineen on hyvä antaa erottua vesifaasista sedimenttiin (3)(4)(6)(13). Tämä on suositeltavaa tehdä samassa lämpötilassa ja ilmastuksessa, joita testissä käytetään. Sopiva tasapainottumisaika määräytyy sedimentin ja kemikaalin mukaan, ja se voi vaihdella tunneista päiviin tai harvinaisissa tapauksissa jopa viikkoihin (4–5 viikkoa). Koska monet kemikaalit voisivat hajota tässä ajassa, tasapainotilaa ei jäädä odottamaan, vaan tasapainottumisajaksi suositellaan 48 tuntia. Tämän tasapainottumisajan jälkeen testiaineen pitoisuus on mitattava sedimentin yläpuolisessa vedessä, huokosvedessä ja sedimentissä vähintään suurimmassa pitoisuudessa ja alemmassa pitoisuudessa (katso kohta 38). Näiden testiaineen analyyttisten määritysten perusteella voidaan laskea massatase, ja tulokset voidaan ilmoittaa mitattujen pitoisuuksien pohjalta.

Testiorganismien lisääminen

25. Neljä tai viisi päivää ennen testiorganismien lisäämistä munamassat otetaan viljelmistä ja pannaan pieniin astioihin kasvatusalustassa. Alustana voidaan käyttää kantaliuoksesta saatua kypsynyttä alustaa tai vasta valmistettua alustaa. Jälkimmäisessä tapauksessa kasvatusalustaan lisätään pieni määrä ravintoa, kuten viherlevää ja/tai muutama pisara hienoksi jauhetuista kalanruokahiutaleista saatua suodosta (katso lisäys 2). Käytä ainoastaan vastamunittuja munamassoja. Tavallisesti toukat alkavat kuoriutua muutama päivä munimisen jälkeen (*Chironomus riparius* 2–3 vrk lämpötilassa 20 °C, *Chironomus tentans* 1–4 vrk lämpötilassa 23 °C ja *Chironomus yoshimatui* 1–4 vrk lämpötilassa 25 °C), ja toukkien kasvu tapahtuu neljässä vaiheessa, joista jokainen kestää 4–8 päivää. Testissä käytetään ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkia (2–3 tai 1–4 vrk kuoriutumisen jälkeen). Sääskien kehitysvaiheen voi tarkistaa pääkapselin leveydestä (6).

26. Kaksikymmentä munatoukkaa sijoitetaan satunnaisesti tylpällä pipetillä jokaiseen testiastiaan, jossa on testiainetta sisältävää sedimenttiä ja vettä. Veden ilmastus on lopetettava, kun toukkia lisätään testiastioihin eikä sitä saa aloittaa 24 tuntiin toukkien lisäämisen jälkeen (katso kohdat 25 ja 32). Käytetyn testisuunnitelman (katso kohdat 19 ja 20) mukaisesti toukkien määrä pitoisuutta kohti on vähintään 60 EC-pisteen arviointia varten ja 80 NOEC-määritystä varten.

Testipitoisuudet

27. Raja-annostesti voi auttaa määrittämään pitoisuusaluetta varsinaista testiä varten. Tähän tarkoitukseen käytetään testiaineen pitoisuuksia laajoin pitoisuusvälein. Jotta surviaissääskien pintatiheys on sama, jota käytetään varsinaisessa testissä, surviaissääsket altistetaan jokaiselle testiaineen pitoisuudelle siksi aikaa, että sopivat testipitoisuudet voidaan arvioida. Rinnakkaisnäytteitä ei tarvita.

28. Varsinaisessa testissä käytettävät testipitoisuudet päätetään raja-annostestin perusteella. Käytössä on oltava vähintään viisi pitoisuutta, jotka valitaan kohdissa 18 ja 20 kuvatulla tavalla.

▼M4

Kontrollit

29. Testissä on käytettävä kontrolliastioita, joissa on sedimenttiä mutta ei testiainetta, ja soveltuvaa määrää rinnakkaisnäytteitä (katso kohdat 19–20). Jos testiaineen lisäyksessä on käytetty liuotinta (katso kohta 16), sedimentin liuotinkontrolli on lisättävä.

Testijärjestelmä

30. Käytettävät järjestelmät ovat staattisia. Puolistaattisia tai läpivirtausjärjestelmiä, joissa sedimentin yläpuolinen vesi uusiutuu ajoittain tai jatkuvasti, voidaan käyttää poikkeustapauksissa, kuten jos vedenlaatu ei sovellu testiorganismille tai vaikuttaa kemialliseen tasapainoon (esim. liuenneen hapen pitoisuus laskee liian matalaksi, eritystuotteiden pitoisuus nousee liian korkeaksi tai sedimentistä uuttuu mineraaleja, jotka vaikuttavat pH-arvoon ja/tai veden kovuuteen). Yleensä muut sedimentin päällä olevan veden laatua kohentavat toimet, kuten ilmastus, ovat kuitenkin riittäviä ja suositeltavia.

Ravinto

31. Toukkia on ruokittava mieluiten päivittäin tai vähintään kolmesti viikossa. Riittävä määrä kalanruokaa (suspensiona vedessä tai hienoksi jauhettuna, esim. TetraMin tai TetraPhyll, lisätietoja lisäyksessä 2) on 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatui* -lajille) päivässä toukkaa kohden ensimmäisten 10 päivän aikana. Tätä vanhemmat toukat voivat tarvita vähän enemmän ruokaa: 0,5–1 mg päivässä toukkaa kohden pitäisi riittää testin loppuun saakka. Ravinnon määrää täytyy pienentää kaikissa käsittelyissä ja kontrolleissa, jos sienikasvua ilmenee tai kontrolleissa esiintyy kuolleisuutta. Jos sienikasvua ei saada loppumaan, testi on toistettava. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva aine (esim. log K_{ow} > 5) tai aine, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, organismien eloonjääntiin ja luontaiseen kasvuun tarvittava ravinnon määrä voidaan lisätä synteettiseen sedimenttiin ennen stabiloitumisvaihetta. Tässä tapauksessa on käytettävä kalanruoan sijaan kasviainesta, kuten 0,5 prosenttia (kuivapaino) nokkosen (*Urtica dioica*), valkomulperin (*Morus alba*), valkoapilan (*Trifolium repens*), pinaatin (*Spinacia oleracea*) tai muun kasviaineksen (*Cerophyl* tai alfaselluloosa) hienoksi jauhettuja lehtiä.

Inkubaatio-olosuhteet

32. Sedimentin päällä olevaa vettä aletaan ilmastaa varovasti mieluiten 24 tuntia toukkien lisäämisen jälkeen, ja ilmastusta jatketaan testin loppuun saakka (on pidettävä huoli, ettei liuenneen hapen pitoisuus laske alle 60 prosenttiin ilman kyllästysarvosta). Ilmastus tapahtuu lasisella Pasteur-pipetillä, joka on kiinnitetty 2–3 senttiä sedimenttikerroksen yläpuolelle (yksi tai muutama kupla sekunnissa). Haihtuvia kemikaaleja testattaessa voidaan harkita, jätetäänkö vesi-sedimenttisysteemi ilmastamatta.

33. Testi tehdään vakiolämpötilassa 20 °C (± 2 °C). Suositeltu lämpötila *C. tentans* -lajille on 23 °C (± 2 °C) ja *C. yoshimatui* -lajille 25 °C (± 2 °C). Valoisa aika on 16 tuntia, ja valon voimakkuuden pitää olla 500–1 000 luksia.

▼M4

Altistuksen kesto

34. Altistus alkaa, kun toukat lisätään astioihin, joissa on testiainetta, ja kontrolliastioihin. Altistuksen enimmäiskesto on 28 vuorokautta lajeille *C. riparius* ja *C. yoshimatsui*, ja 65 vuorokautta lajille *C. tentans*. Jos sääsket kuoriutuvat aikaisemmin, testi voidaan lopettaa vähintään viisi päivää sen jälkeen, kun viimeinen surviaissääski on kasvanut täysikasvuiseksi kontrollissa.

Havainnot

Kuoriutuminen

35. Kehitysaika ja täysin kuoriutuneiden uros- ja naarassääskien yhteismäärä määritetään. Urokset tunnistaa helposti sulkamaisista tuntosarvista.

36. Testiastioita on tarkkailtava vähintään kolmesti viikossa ja epänormaalia käyttäytymistä on arvioitava silmämääräisesti (esim. sedimentistä poistuminen, epätavallinen uinti) kontrolliin verrattuna. Sääsket on laskettava päivittäin, kun kuoriutuminen on odotettavissa. Täysikasvuisten sääskien sukupuoli ja lukumäärä kirjataan päivittäin. Tunnistuksen jälkeen sääsket poistetaan astioista. Ennen testin loppua mahdollisesti munitut munamassat on kirjattava ylös ja poistettava, jottei sedimenttiin tule lisää toukkia. Myös niiden näkyvissä olevien koteloiden määrä, jotka eivät ole kuoriutuneet, on merkittävä ylös. Kuoriutumisen mittausohjeet ovat lisäyksessä 5.

Kasvu ja eloonjääänti

37. Jos tiedot 10 vuorokauden toukkien eloonjäännistä ja kasvusta tarvitaan, testin alussa on otettava käyttöön ylimääräisiä testiastioita myöhempää käyttöä varten. Toukat seulotaan ylimääräisten astioiden sedimentistä 250 µm:n seulalla. Kuolleiksi lasketaan toukat, jotka eivät liiku tai reagoi mekaanisiin ärsykkeisiin. Myös ne toukat, joita ei otettu talteen, lasketaan kuolleiksi (mikrobit ovat saattaneet hajottaa testin alussa kuolleet toukat). Eloonjääneiden toukkien (tuhkaton) kuivapaino testiastiaa kohden määritetään ja yksilön keskimääräinen kuivapaino astiassa lasketaan. On hyödyllistä määrittää, missä kehitysvaiheessa eloonjääneet toukat ovat. Tähän tarkoitukseen voidaan mitata kunkin toukan pääkapselin leveys.

Mittaukset

Testiaineen pitoisuus

38. Ennen testin aloittamista (eli toukkien lisäämistä) otetaan sedimenttinäytteet (bulk) vähintään yhdestä astiasta käsittelyä kohden, jotta testiaineen pitoisuus sedimentissä voidaan määrittää. On suositeltavaa, että vähintään yläpuolisen veden, huokosveden ja sedimentin näytteet analysoidaan testin alussa (katso kohta 24) ja lopussa suurimmassa pitoisuudessa ja matalammassa pitoisuudessa. Testiaineen pitoisuudesta saadaan tietoa testiaineen käyttäytymisestä ja jakautumisesta vesi-sedimenttisysteemissä.

39. Jos välimittauksia tehdään (esim. päivänä 7) ja analyysiin tarvitaan suuria näytteitä, joiden ottaminen testiastioista vaikuttaisi testijärjestelmään, analyyttisiin määrityksiin käytetään ylimääräisistä testiastioista otettuja näytteitä. Näitä astioita käsitellään samalla tavoin kuin testiastioita (mukaan lukien testiorganismien lisääminen), mutta niitä ei käytetä biologiseen havainnointiin.

▼M4

40. Huokosveden suositeltava eristystapa on sentrifugointi (esim. 10 000 g ja 4 °C 30 minuutin ajan). Jos on kuitenkin osoitettu, että testiaine ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää. Joskus pitoisuuksien analysointi huokosvedestä ei ole mahdollista, koska näyte on liian pieni.

Fysikaalis-kemialliset parametrit

41. Testiastioiden pH ja lämpötila on mitattava asiaankuuluvasti (katso kohta 10). Kovuus ja ammoniakki on mitattava kontrolliastioissa ja yhdessä testiastiassa suurimmalla pitoisuudella testin alussa ja lopussa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

42. Tämän testin tarkoituksena on määrittää testiaineen vaikutus uros- ja naarassääskien kehittymisnopeuteen ja täysin kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärään. 10 päivän testissä määritetään vaikutukset toukkien eloonjääntiin ja painoon. Jos eri sukupuolten herkkyydessä ei ilmene tilastollisesti merkitsevää eroa, urosten ja naaraiden tulokset voidaan yhdistää tilastollisia analyysejä varten. Sukupuolten väliset herkkyyserot voidaan määrittää tilastotieteellisesti esimerkiksi χ^2-r × 2 -taulukkotestillä. Toukkien eloonjäänti ja yksilön keskimääräinen kuivapaino astiaa kohden määritetään 10 päivän kuluttua, jos tarpeen.

43. Kuivapainoon perustuvat vaikutuspitoisuudet lasketaan mieluiten testin alussa mitattujen sedimenttipitoisuuksien perusteella (katso kohta 38).

44. EC_{50}:n tai minkä tahansa muun EC_x:n piste-estimaattia laskettaessa astiakohtaisia tilastotietoja voidaan käyttää aitoina toistoina. Laskettaessa minkä tahansa EC_x-arvon luottamusväliä astioiden välinen vaihtelu on otettava huomioon tai vaihtoehtoisesti osoitettava vaihtelu niin pieneksi, että se voidaan jättää huomiotta. Jos malliin sovelletaan pienimmän neliösumman menetelmää, astiakohtaisiin tilastotietoihin on sovellettava muunnosta, jotta varianssin homogeenisuus paranee. EC_x-arvot on kuitenkin laskettava sen jälkeen, kun vaste on muunnettu takaisin alkuperäisarvoon.

45. Kun NOEC/LOEC on tarkoitus määrittää tilastollisen hypoteesin testillä, astioiden välinen vaihtelu on huomioitava esimerkiksi hierarkkisella ANOVAlla. Robustimpia testejä (21) voidaan käyttää soveltuvissa tilanteissa, kun tavalliset ANOVAn oletukset eivät täyty.

Kuoriutumisaste

46. Kuoriutumisasteet ovat dikotomisia tietoja, ja ne voidaan analysoida Cochran-Armitagen testillä, jota sovelletaan alaspäin askeltavasti, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa, ja näitä tietoja pidetään tämän odotuksen mukaisina. Jos näin ei ole, voidaan käyttää Fisherin tarkkaa testiä tai Mantel-Haenszelin testiä, jossa p-arvot on korjattu Bonferroni-Holmin menetelmällä. Jos on näyttöä siitä, että saman pitoisuuden toistojen välinen varianssi on suurempi kuin binomijakauma antaa edellyttää (ylihajonta), voidaan käyttää Cochran-Armitagen testiä tai Fisherin tarkkaa testiä (21).

▼**M4**

Kuoriutuneiden sääskien määrä astiassa (ne) määritetään, ja summa jaetaan lisättyjen sääskien määrällä (na):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

jossa:

ER = kuoriutumisaste

n_e = kuoriutuneiden sääskien määrä astiassa

n_a = astiaan lisättyjen toukkien määrä

47. Kun näytekoko on suuri ja ylihajontaa esiintyy, paras vaihtoehto on pitää kuoriutumisastetta jatkuvana vasteena ja käyttää esimerkiksi Williamsin testiä, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa ja yhdenmukainen kuoriutumisastetietojen kanssa. Dunnettin testi soveltuu, kun monotonisuutta ei esiinny. Näytekoko määritetään tässä suureksi, jos sekä kuoriutuneiden että kuoriutumattomien toukkien määrä on toistossa (astiassa) yli viisi.

48. Jos halutaan soveltaa ANOVA-menetelmiä, ER-arvot on ensin muunnettava arcsin-neliöjuuri-muunnoksella tai Tukey-Freemanin muunnoksella, jotta saadaan likimääräinen normaalijakauma ja varianssi tasoittuu. Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferroni) tai Mantel-Haenszelin testiä voidaan soveltaa, kun käytetään absoluuttisia frekvenssejä. Arcsin-neliöjuuri-muunnosta sovelletaan ottamalla kuoriutumisasteen neliöjuuren käänteinen sini ($\sin^{-1}$).

49. Kuoriutumisasteissa EC_x-arvot lasketaan käyttämällä regressioanalyysiä (tai esim. probit- (22), logit- tai Weibull-mallia tai soveltuvaa kaupallista ohjelmistoa). Jos regressioanalyysi epäonnistuu (esim. osittaisia vasteita on alle kaksi), käytetään muita parametrittomia menetelmiä, kuten liukuvaa keskiarvoa tai yksinkertaista interpolaatiota.

Kehittymisnopeus

50. Keskimääräinen kehittymisaika edustaa keskimääräistä ajanjaksoa toukkien lisäämisestä (testipäivä 0) kokeellisen sääskikohortin kuoriutumiseen. (Aidon kehittymisajan laskennassa on huomioitava toukkien ikä lisäyshetkellä.) Kehittymisnopeus on kehittymisajan käänteisluku (yksikkö: 1/vrk) ja edustaa päivässä tapahtuvaa toukkien kehittymistä. Kehittymisnopeuden käyttö on suositeltavaa näiden sedimentin toksisuuskokeiden arvioinnissa, sillä sen varianssi on pienempi ja se on homogeenisempi ja lähempänä normaalijakaumaa kuin kehittymisaika. Siksi tehokkaita parametritestimenetelmiä käytetään mieluummin kehittymisnopeuden kuin kehittymisajan kanssa. Kun kehittymisnopeus on jatkuva vaste, EC_x-arvot voidaan estimoida regressioanalyysillä (esim. (23), (24)).

51. Seuraavissa tilastollisissa testeissä oletetaan, että tarkastuspäivänä × havaittu sääskimäärä kuoriutuu päivän x ja päivän x-l välissä (l = tarkastusvälin pituus, yleensä 1 päivä). Keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa (x) lasketaan seuraavasti:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

jossa:

$\bar{x}$: keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa

i: tarkastusvälin indeksi

m: tarkastusvälien enimmäismäärä

f_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien määrä

n_e: testin lopussa kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärä ($=\sum f_i$)

x_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien kehittymisnopeus

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

jossa:

day_i: tarkastuspäivä (päivää lisäyksen jälkeen)

l_i: tarkastusvälin i pituus (päivissä, yleensä 1 päivä)

Testiraportti

52. Testiraportin on sisällettävä vähintään seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (vesiliukoisuus, höyrynpaine, jakaantumiskerroin maa-aineksessa (tai sedimentissä, jos saatavissa), stabiilisuus vedessä jne.)

— kemialliset tunnistetiedot (yleisnimi, kemiallinen nimi, rakennekaava, CAS-numero jne.) sekä puhtaus ja testiaineen kvantifioinnissa käytetty analyysimenetelmä.

Testilajit:

— käytetyt koe-eläimet: lajit, tieteellinen nimi, eliöiden lähde ja kasvatusolosuhteet

— tiedot munamassojen ja toukkien käsittelystä

— koe-eläinten ikä testiastioihin lisättäessä.

Testiolosuhteet:

— käytetty sedimentti, eli luonnollinen vai synteettinen sedimentti

— luonnollisen sedimentin osalta sedimentin näytteenottopaikan sijainti ja kuvaus, mukaan lukien, jos mahdollista, kontaminaatiohistoria, ominaisuudet: pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, C/N-suhde ja rakeisuus (tarvittaessa)

— synteettisen sedimentin valmistus: ainesosat ja niiden ominaisuudet (orgaanisen hiilen pitoisuus, pH, kosteus jne. testin alussa)

— testiveden valmistus (jos käytetään synteettistä vettä) ja ominaisuudet (happipitoisuus, pH, johtavuus, kovuus jne. testin alussa)

— sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys

— sedimentin päällä olevan veden ja huokosveden tilavuus, märän sedimentin paino huokosveden kanssa ja ilman huokosvettä

▼M4

— testiastiat (materiaali ja koko)

— tapa, jolla testiaine lisättiin sedimenttiin: käytetyt pitoisuudet, toistojen määrä ja mahdollisen liuottimen käyttö

— vesi-sedimenttisysteemin stabilointivaihe: kesto ja olosuhteet

— inkubaatio-olosuhteet: lämpötila, valojakso ja valon voimakkuus, ilmastus (taajuus ja voimakkuus)

— yksityiskohtaiset tiedot syöttämisestä, kuten ravinnon tyyppi, valmistus, määrä ja syöttöaikataulu.

Tulokset:

— kaikki nimelliset testipitoisuudet, mitatut testipitoisuudet ja tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritettiin testiaineen pitoisuus testiastiassa

— testiastioissa olevan veden laatu, eli pH, lämpötila, liuennut happi, kovuus ja ammoniakki

— mahdollinen haihtuneen testiveden korvaus

— kuoriutuneiden uros- ja naarassääskien määrä astiassa päivää kohden

— kuoriutumattomien toukkien määrä astiassa

— toukkien keskimääräinen kuivapaino astiaa kohden, kehitysasteittain jos tarpeen

— kuoriutumisprosentti rinnakkaisnäytteessä ja testipitoisuudessa (uros- ja naarassääsket yhteensä)

— täysin kuoriutuneiden sääskien keskimääräinen kehittymisnopeus rinnakkaisnäytteessä ja testissä (uros- ja naarassääsket yhteensä)

— toksisten tutkittavien ominaisuuksien estimaatit, kuten EC_x (ja siihen liittyvät luottamusvälit), NOEC ja/tai LOEC, ja niiden määrittämiseen käytetyt tilastolliset menetelmät

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8) US-EPA/OPPTS 850,1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14) Tämän liitteen testimenetelmä C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla.

15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.

18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482–491.

19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

Synteettinen sedimentti on luonnollisen sedimentin fyysisiä ainesosia jäljittelevistä materiaaleista valmistettu seos.

Yläpuolinen vesi on testiastiassa sedimentin päällä oleva vesi.

Huokosvesi on sedimenttirakeiden välissä olevaa vettä.

Sedimentti, johon on lisätty testiaine.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

Lisäys 2

***Chironomus riparius* -lajin kasvatussuosituksia**

1. *Chironomus*-toukkia voi kasvattaa kiteytysmaljoissa tai suurissa astioissa. Astian pohjalle levitetään noin 5–10 mm:n paksuinen kerros hienoa kvartsihiekkaa. Myös piimaa (esim. Merck, tuotenro 8117) on osoitettu soveltuvaksi substraatiksi (ohuempi, enintään muutaman millimetrin paksuinen kerros riittää). Sen jälkeen lisätään monta senttiä soveltuvaa vettä. Jos haihtumista tapahtuu, kuivuminen on estettävä lisäämällä vettä tarvittaessa. Vesi voidaan vaihtaa tarvittaessa. Varovainen ilmastus on tarpeen. Toukkien kasvatusastioita on säilytettävä soveltuvassa häkissä, jotta kuoriutuvat aikuiset eivät pääse pakenemaan. Häkin on oltava tarpeeksi tilava, jotta kuoriutuneet aikuiset mahtuvat parveilemaan. Muutoin parittelua ei välttämättä tapahdu (vähimmäiskoko on n. 30 × 30 × 30 cm).

2. Häkkejä säilytetään huoneenlämmössä tai huoneessa, jonka lämpötila on vakioitu (20 ± 2 °C). Valoisa jakso on 16 tuntia (voimakkuus n. 1 000 luksia), pimeys 8 tuntia. On ilmoitettu, että lisääntyminen voi estyä, jos ilman suhteellinen kosteus on alle 60 prosenttia.

Laimennusvesi

3. Mitä tahansa soveltuvaa luonnollista tai synteettistä vettä voidaan käyttää. Kaivovesi, talousvesi, josta on poistettu kloori, ja keinotekoinen neste (esim. Elendtin ”M4”- tai ”M7”-liuos, ks. jäljempänä) ovat yleisesti käytettyjä. Vesi on ilmastettava ennen käyttöä. Kasvatusvesi voidaan tarvittaessa uusia kaatamalla tai lappamalla käytetty vesi kasvatusastioista varoen tuhoamasta toukkaputkia.

Toukkien ruokinta

4. *Chironomus*-toukat ruokitaan kalojen hiutaleruoalla (TetraMin®, TetraPhyll® tai muu vastaava kaupallinen kalanruoka), jota annetaan noin 250 mg astiaa kohden päivässä. Ruoka voidaan antaa kuivana jauheena tai suspensiona vedessä: 1,0 g hiutaleruokaa lisätään 20 ml:aan laimennusvettä ja seos sekoitetaan homogeeniseksi. Tätä valmistetta voi antaa noin 5 ml astiaa kohden päivässä (ravista ennen käyttöä). Vanhoille toukille voi antaa enemmän ruokaa.

5. Ruokkimista säädellään vedenlaadun mukaan. Jos kasvatusalusta muuttuu sameaksi, ravinnon määrää on vähennettävä. Ravinnon määrän lisäämistä on seurattava tarkasti. Jos ravintoa on liian vähän, toukat siirtyvät kohti vesipatsasta, ja jos ravintoa on liian paljon, mikrobien toiminta voi lisääntyä ja happipitoisuudet laskea. Kumpikin vaihtoehto voi laskea kasvunopeutta.

6. Vähän viherlevän (esim. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) soluja voidaan lisätä, kun uusia kasvatusastioita perustetaan.

Kuoriutuneiden aikuisten ruokinta

7. Eräät kokeen suorittajat ovat ehdottaneet, että kylläisessä sakkaroosiliuoksessa liotettu vanutuppo saattaa riittää kuoriutuneiden aikuisten ravinnoksi.

▼M4

Kuoriutuminen

8. Kun lämpötila on 20 ± 2 °C, toukkien kasvatusastioista alkaa kuoriutua aikuisia noin 13–15 päivän kuluttua. Urokset tunnistaa helposti sulkamaisista tuntosarvista.

Munamassat

9. Kun kasvatushäkissä on aikuisia, kaikista toukkien kasvatusastioista on tarkistettava kolme kertaa viikossa, onko niissä hyytelömäisiä munamassoja. Jos munamassoja on, ne on poistettava varovasti. Ne siirretään pieneen astiaan, jossa on pieni määrä kasvatusvettä. Munamassoja voi käyttää uuden viljelyastian perustamiseen (esim. 2–4 munamassaa astiaa kohden) tai toksisuustesteihin.

10. Munatoukkien pitäisi kuoriutua 2–3 päivän kuluttua.

Uusien viljelyastioiden perustaminen

11. Kun viljelmät on perustettu, uuden toukkaviljelyastian voi aloittaa testivaatimusten mukaan kerran viikossa tai harvemmin. Vanhat astiat poistetaan, kun aikuiset sääsket ovat kuoriutuneet. Näin saadaan säännöllisesti aikuisia mahdollisimman vähäisellä vaivalla.

Testiliuosten ”M4” ja ”M7” valmistus

12. Elendt (1990) kuvasi ”M4”-liuoksen. ”M7”-liuos valmistetaan samoin kuin ”M4” lukuun ottamatta taulukossa 1 merkittyjä aineita, joiden pitoisuus on neljä kertaa pienempi ”M7”-liuoksessa kuin ”M4”-liuoksessa. ”M7”-liuosta koskeva julkaisu on valmisteilla (Elendt, henkilökohtainen viesti). Testiliuosta ei valmisteta Elendtin ja Biasin mukaan (1990), sillä kantaliuosten valmistusta varten annetut $NaSiO_3$-, 5 H_2O-, $NaNO_3$-, KH_2PO_4- ja K_2HPO_4-pitoisuudet eivät ole riittäviä.

”M7”-liuoksen valmistus

13. Jokainen kantaliuos (I) valmistetaan erikseen, ja näistä kantaliuoksista (I) valmistetaan yhdistetty kantaliuos (II) (katso taulukko 1). ”M7”-liuos valmistetaan täyttämällä 50 millilitraa yhdistettyä kantaliuosta (II) ja taulukossa 2 annetut määrät jokaista makroravinteiden kantaliuosta 1 litraksi deionisoitua vettä. Vitamiinien kantaliuos valmistetaan lisäämällä deionisoituun veteen kolmea vitamiinia taulukon 3 mukaisesti, ja 0,1 millilitraa yhdistettyä vitamiinien kantaliuosta lisätään lopulliseen ”M7”-liuokseen vähän ennen käyttöä. (Vitamiinien kantaliuos säilytetään jäädytettynä pienissä erissä.) Liuos ilmastetaan ja stabiloidaan.

KIRJALLISUUSVIITTEET

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Taulukko 1

Hivenaineiden kantaliuokset M4- ja M7-liuosta varten

Kantaliuokset (I)	Määrä (mg), joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä	Yhdistetyn kantaliuoksen (II) valmistus: Sekoita seuraavat määrät (ml) kantaliuoksia (I) ja täytä 1 litraksi deionisoitua vettä		Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Nämä aineet ovat erilaiset M4- ja M7-liuoksissa, kuten edellä kerrottiin.
(2) Nämä liuokset valmistetaan erikseen. Sitten ne kaadetaan yhteen ja käsitellään välittömästi autoklaavissa.

Taulukko 2

Makroravinteiden kantaliuokset M4- ja M7-liuosta varten

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn makroravinteiden kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Taulukko 3

Vitamiinien kantaliuos M4- ja M7-liuosta varten. Kaikki kolme vitamiiniliuosta yhdistetään yhdeksi vitamiinien kantaliuokseksi.

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn vitamiinien kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinihydrokloridi	750	0,1	0,075
Syaanikobalamiini (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiini	7,5	0,1	0,00075

KIRJALLISUUSVIITTEET

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

Lisäys 3

SYNTEETTISEN SEDIMENTIN VALMISTUS

Sedimentin koostumus

Synteettisen sedimentin koostumuksen on oltava seuraavanlainen:

Ainesosa	Ominaisuudet	Prosenttiosuus sedimentin kuivapainosta
Turve	Rahkasuoturvetta, pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0, ei näkyviä kasvijäänteitä, hienoksi jauhettuna (hiukkaskoko ≤ 1 mm) ja ilmakuivattuna	4–5
Kvartsihiekka	Raekoko: > 50 prosenttia hiukkasista on oltava kokoa 50–200 μm	75–76
Kaoliniittisavi	Kaoliniittipitoisuus ≥ 30 %	20
Orgaaninen hiili	Säädetään lisäämällä turvetta ja hiekkaa	2 (± 0,5)
Kalsiumkarbonaatti	$CaCO_3$, jauhettu, kemiallisesti puhdas	0,05–0,1
Vesi	Johtavuus ≤ 10 μS/cm	30–50

Valmistelut

Turve ilmakuivataan ja jauhetaan hienoksi. Tarvittava määrä turvejauhetta suspendoidaan deionisoituun veteen käyttämällä tehokasta homogenisointilaitetta. Suspension pH-arvoksi säädetään 5,5 ± 0,5 $CaCO_3$:lla. Suspension annetaan vakioitua vähintään kahden päivän ajan sekoittamalla sitä varovasti lämpötilassa 20 ± 2 °C, jotta pH stabiloituu ja saadaan stabiili mikrobikomponentti. Sen jälkeen pH mitataan uudelleen. Arvon pitäisi olla 6,0 ± 0,5. Sen jälkeen turvesuspensioon sekoitetaan muut ainesosat (hiekka ja kaoliniittisavi) ja deionisoitu vesi, jotta saadaan homogeenistä sedimenttiä, jonka vesipitoisuus on 30–50 prosenttia sedimentin kuivapainosta. Lopullisen seoksen pH mitataan vielä kerran, ja se säädetään tarvittaessa $CaCO_3$:lla alueelle 6,5–7,5. Sedimentistä otetaan näytteitä, joista määritetään kuivapaino ja orgaanisen hiilen pitoisuus. On suositeltavaa, että synteettistä sedimenttiä sopeutetaan ennen chironomid-eliöillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat.

Säilytys

Synteettisen sedimentin kuivia ainesosia voi säilyttää kuivassa ja viileässä paikassa huoneenlämmössä. Valmistettua (märkää) sedimenttiä ei saa säilyttää ennen käyttöä tässä testissä. Se on käytettävä heti valmistuksen lopussa olevan 7 päivän sopeutusajan jälkeen.

KIRJALLISUUSVIITTEET

Tämän liitteen luku C.8. Myrkyllisyystutkimus madoilla.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼M4

Lisäys 4

Hyväksyttävän laimennusveden kemialliset ominaisuudet

Aine	Pitoisuudet
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 µg/l
Kovuus $CaCO_3$:na	< 400 mg/l (*)
Jäännöskloori	< 10 mg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

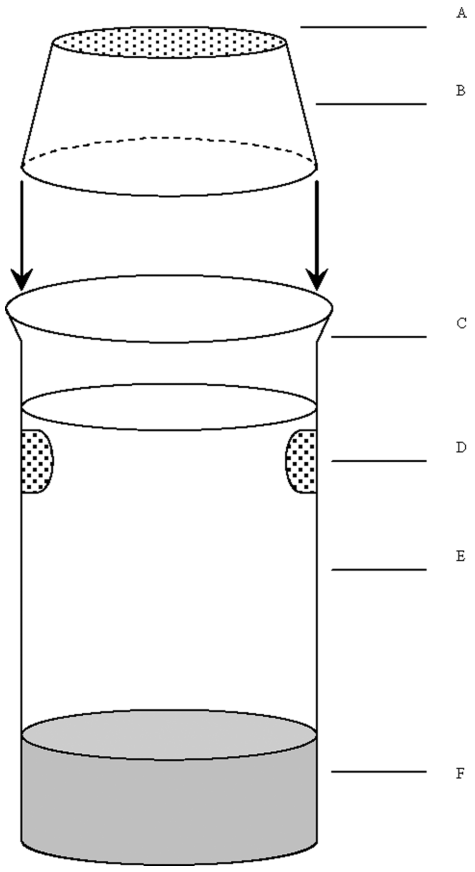
(*) Jos kovuusionien ja testiaineen välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä).

▼**M4**

Lisäys 5

Chironomid-toukkien kuoriutumisen tarkkailuohjeet

Dekantterilaseihin asetetaan pyydykset kuoriutuneita toukkia varten. Näitä pyydyksiä tarvitaan päivästä 20 lähtien testin loppuun saakka. Alla on esimerkki käytetystä pyydyksestä:



A: polyamidiverkko

B: ylösalaisin käännetyt muovikupit

C: reunukseton altistusdekantterilasi

D: verkkoaukot vedenvaihtoa varten

E: vettä

F: sedimentti

▼M4

C.28 MYRKYLLISYYSTESTI CHIRONOMID-ELIÖLLÄ VESI-SEDIMENTTISYSTEEMISSÄ KÄYTTÄEN VETTÄ, JOHON TUTKITTAVAA AINETTA ON LISÄTTY

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 219 (2004). Tällä testimenetelmällä on tarkoitus arvioida pitkäaikaisen kemikaalialtistuksen vaikutuksia makean veden kaksisiipisen *Chironomus*-lajin (surviaissääsken) toukkiin, jotka elävät sedimentissä. Menetelmä perustuu pääosion BBA:n ohjeistukseen, jossa käytetään vesi-sedimenttisysteemiä, keinomaata ja vesipatsaan altistusmenetelmää (1). Siinä huomioidaan myös *Chironomus riparius*- ja *Chironomus tentans* -lajien toksisuustestimenettelyt, jotka on kehitetty Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) ja vahvistettu yhteistutkimuksissa (ring-test) (1)(6)(9). Myös muita hyvin dokumentoituja chironomid-lajeja, kuten *Chironomus yoshimatsui* (10)(11), voidaan käyttää.

2. Tässä testimenetelmässä altistaminen tapahtuu lisäämällä testiainetta veteen. Soveltuvan altistuksen valinta määräytyy testin sovellustarkoituksen mukaan. Vesialtistuksessa, jossa testiainetta lisätään vesipatsaaseen, tarkoituksena on simuloida torjunta-aineiden lentosumutusta. Se kattaa alkuhuippupitoisuudet huokosvedessä. Menetelmä on hyödyllinen myös muuntyyppisissä altistuksissa (mukaan lukien kemikaalivuoto) lukuun ottamatta kertymisprosesseja, jotka kestävät kauemmin kuin testijakso.

3. Aineet, joita sedimentissä elävillä eliöillä testataan, säilyvät yleensä sedimentissä pitkään. Sedimentissä elävien eliöiden altistamiseen voidaan käyttää useita reittejä. Jokaisen altistusreitin suhteellinen tärkeys sekä toksiseen kokonaisvaikutukseen vaadittava aika määräytyvät käytettävän kemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva aine (esim. log K_{ow} > 5) tai aine, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, kontaminoituneen ravinnon nauttiminen voi olla tärkeä altistusreitti. Jotta hyvin rasvahakuisten aineiden myrkyllisyyttä ei aliarvioida, voidaan harkita ravinnon lisäämistä sedimenttiin ennen testiaineen lisäämistä. Jotta kaikki mahdolliset altistusreitit voidaan huomioida, tämä testimenetelmä keskittyy pitkäaikaiseen altistukseen. Testin kesto on 20–28 päivää *C. riparius*- ja *C. yoshimatsui* -lajeille ja 28–65 päivää *C. tentans* -lajille. Jos lyhytaikaisia tietoja tarvitaan tiettyyn tarkoitukseen, kuten epävakaiden kemikaalien vaikutusten tutkimiseen, ylimääräiset rinnakkaisnäytteet voidaan poistaa 10 päivän jälkeen.

4. Mitatut tutkittavat ominaisuudet ovat kuoriutuneiden täysikasvuisten kokonaismäärä ja kuoriutumiseen kulunut aika. Jos lyhytaikaiset lisätiedot ovat tarpeen, toukkien eloonjäämistä ja kasvua on suositeltavaa mitata vasta kymmenen päivän kuluttua käyttämällä ylimääräisiä rinnakkaisnäytteitä.

5. Synteettisen sedimentin käyttö on suositeltavaa. Synteettisellä sedimentillä on useita etuja luonnolliseen sedimenttiin verrattuna:

— kokeellinen vaihtelu vähenee, koska sedimentti on toistettava ”vakiomatriisi”, eikä kontaminoitumattomia ja puhtaita sedimenttilähteitä tarvitse etsiä

— testit voidaan aloittaa milloin tahansa ilman, että testisedimentin kausivaihtelua esiintyy, sedimentistä ei tarvitse poistaa alkuperäiselimistöä esikäsittelyllä ja lisäksi synteettisen sedimentin käyttö pienentää kuluja, joita rutiinitestaukseen tarvittavan sedimenttimäärän keräämisestä kentältä syntyy

▼M4

— synteettisen sedimentin käyttö sallii toksisuuden vertailun ja aineiden lajittelemisen myrkyllisyyden mukaan: testien, joissa käytettiin luonnollista sedimenttiä ja synteettistä sedimenttiä, toksisuustiedot olivat verrattavissa useiden kemikaalien osalta (2).

6. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

7. Surviaissääsken munatoukat altistetaan testiaineen pitoisuusalueelle vesi-sedimenttisysteemeissä. Testi aloitetaan lisäämällä munatoukkia dekantterilaseihin, joissa on vesi-sedimenttisysteemiä, ja lisäämällä sen jälkeen testiainetta veteen. Surviaissääskien kuoriutumisaste ja kehittymisnopeus mitataan testin lopussa. Toukkien eloonjäänti ja paino voidaan myös tarvittaessa mitata 10 päivän kuluttua (käytättämällä soveltuvia ylimääräisiä rinnakkaisnäytteitä). Nämä tiedot analysoidaan regressiomallilla, jolla arvioidaan pitoisuus, joka aiheuttaa X prosentin laskun kuoriutumisessa, toukkien eloonjäännissä tai painossa (esim. EC_{15}, EC_{50}), tai tilastollisen hypoteesin testillä, jolla määritetään NOEC/LOEC. Jälkimmäinen vaihtoehto edellyttää vaikutusarvojen vertaamista vertailuarvoihin tilastotutkimuksilla.

TESTIAINETTA KOSKEVIA TIETOJA

8. Testiaineen vesiliukoisuuden, höyrynpaineen, mitatun tai lasketun erottumisen erottuminen sedimenttiin sekä stabiiliuden vedessä ja sedimentissä on oltava tiedossa. Käytössä on oltava luotettava analyysimenetelmä, jolla testiaine voidaan kvantifioida sedimentin päällä olevassa vedessä, huokosvedessä ja sedimentissä, ja menetelmän tarkkuus ja havaitsemisraja tunnetaan ja ne on raportoitu. Hyödyllisiä tietoja ovat esimerkiksi rakennekaava ja testiaineen puhtaus. Myös testiaineen kemiallinen kohtalo (esim. häviäminen, abioottinen ja bioottinen hajoaminen) on hyödyllistä tietää. Kirjallisuusviitteessä (12) annetaan lisäohjeita sellaisten aineiden testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

VERTAILUKEMIKAALIT

9. Testimenettelyn ja testiolosuhteiden luotettavuus voidaan tarkistaa testaamalla ajoittain vertailukemikaaleja. Esimerkkejä vertailumyrkyistä, joita on käytetty onnistuneesti yhteistutkimuksissa ja validointitutkimuksissa: lindaani, trifluraliini, pentakloorifenoli, kadmiumkloridi ja kaliumkloridi. (1)(2)(5)(6)(13).

TESTIN LUOTETTAVUUS

10. Testi on luotettava, jos

— kuoriutuvuus kontrolleissa on vähintään 70 prosenttia testin lopussa (1)(6)

— *C. riparius* ja *C. yoshimatsui* aikuistuvat kontrolliastioissa 12–23 päivän kuluessa astiaan laittamisesta. *C. tentans* vaatii 20–65 päivää

— testin lopussa mitataan jokaisen astian pH ja liuenneen hapen pitoisuus. Happipitoisuuden täytyy olla vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta (ASV) käytetyssä lämpötilassa, ja sedimentin päällä olevan veden pH-arvon pitää olla 6–9 kaikissa testiastioissa

▼M4

— veden lämpötila vaihtelee enintään ± 1,0 °C. Veden lämpötilaa voidaan kontrolloida tasalämpöisessä huoneessa, jolloin huoneen lämpötila on tarkistettava soveliain väliajoin.

MENETELMÄN KUVAUS

Testiastiat

11. Tutkimus tehdään 600 ml:n dekantterilaseissa, joiden halkaisija on 8 cm. Muitakin astioita voidaan käyttää, kunhan sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys on sopiva. Sedimentin pinta-alan on oltava riittävä, jotta tilaa on 2–3 cm^2 toukkaa kohden. Sedimenttikerroksen ja sen päällä olevan veden syvyyden suhteen on oltava 1:4. Testiastioiden ja muiden testijärjestelmän kanssa kosketuksissa olevien välineiden on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia (esim. teflonia).

Lajin valinta

12. Paras laji tähän testiin on *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* soveltuu myös, mutta sen käsittely on hankalampaa ja se edellyttää pidempää testijaksoa. Myös *Chironomus yohimatsui* -lajia voidaan käyttää. Tietoa *Chironomus riparius* -lajin kasvatusmenetelmistä on lisäyksessä 2. Myös muiden lajien kasvatusolosuhteista on saatavissa tietoa: *Chironomus tentans* (4) and *Chironomus yoshimatsui* (11). Lajin tunnistus on varmistettava ennen testiä, mutta sitä ei ole tarpeen tehdä ennen joka testiä, jos eliöt ovat peräisin omasta kasvattamosta.

Sedimentti

13. Synteettisen sedimentin (keinosedimentin) käyttö on suositeltavaa. Jos kuitenkin käytetään luonnollista sedimenttiä, se on kuvailtava (vähintään pH, orgaaninen kokonaishiilipitoisuus, mutta myös muut parametrit, kuten C/N-suhde ja rakeisuus ovat suositeltavia), eikä siinä saa olla kontaminaatiota tai muita organismeja, jotka saattavat kilpailla chironomid-eliöiden kanssa tai syödä ne. Lisäksi on suositeltavaa, että luonnollista sedimenttiä sopeutetaan ennen chironomid-eliöillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat. Tätä testiä varten suositellaan seuraavaa synteettistä sedimenttiä, joka perustuu testimenetelmässä C.8 (14) käytettyyn keinomaahan (1)(15)(16):

a) 4–5 % (kuivapaino) turvetta: pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0; on tärkeää käyttää ainoastaan ilmakuivattua jauhemaista turvetta, joka on jauhettu hienoksi (hiukkaskoko ≤ 1 mm)

b) 20 % (kuivapaino) kaoliniittisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 %)

c) 75–76 % (kuivapaino) kvartsihiekkaa (pääosin hienoa hiekkaa, yli 50 prosenttia 50–200 μm:n hiukkasia)

d) deionisoitua vettä lisätään, kunnes lopullisen seoksen kosteus on 30–50 %

e) kemiallisesti puhdasta kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$) lisätään, jotta lopullisen sedimenttiseoksen pH-arvoksi tulee 7,0 ± 0,5

f) orgaanisen hiilen pitoisuuden on oltava lopullisessa seoksessa 2 % (± 0,5 %). Sitä voidaan säätää lisäämällä sopiva määrä turvetta ja hiekkaa kohtien a ja c mukaisesti.

▼M4

14. Turpeen, kaoliniittisaven ja hiekan alkuperän on oltava tiedossa. Tarkista, ettei sedimentin ainesosissa ole kemikaalista kontaminaatiota (esim. raskasmetalleja, orgaanisia klooriyhdisteitä ja orgaanisia fosforiyhdisteitä). Esimerkki synteettisen sedimentin valmistuksesta on lisäyksessä 3. Myös kuivien ainesosien sekoittaminen on hyväksyttävää, jos voidaan osoittaa, että sedimentin ainesosat eivät erotu (esim. kelluvia turvehiukkasia) veden lisäämisen jälkeen ja että turve tai sedimentti on sopeutunut tarpeeksi.

Vesi

15. Testivedeksi soveltuu vesi, joka täyttää lisäyksissä 2 ja 4 luetellut laimennusveden kemialliset ominaisuudet. Kasvatus- ja testivedeksi soveltuu mikä tahansa vesi, luonnonvesi (pinta- tai pohjavesi), synteettinen vesi (katso lisäys 2) tai talousvesi, josta on poistettu kloori, jos surviaissääsket voivat elää siinä viljelyn ja testauksen ajan osoittamatta stressaantumisen merkkejä. Testiveden pH-arvon on oltava testin alussa 6–9, eikä kokonaiskovuus $CaCO_3$:na saa olla yli 400 mg/l. Jos kovuusionien ja testiaineen välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä). Samantyyppistä vettä on käytettävä koko tutkimuksen ajan. Lisäyksessä 4 luetellut vedenlaadun ominaisuudet on mitattava vähintään kahdesti vuodessa tai aina kun on epäilystä siitä, että nämä ominaisuudet ovat voineet muuttua merkittävästi.

Kantaliuokset – vesi, johon on lisätty testiainetta

16. Testipitoisuudet lasketaan vesipatsaan eli sedimentin päällä olevan veden pitoisuuksien perusteella. Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan tavallisesti kantaliuoksista laimentamalla. Kantaliuokset valmistetaan mieluiten liuottamalla testiainetta testiviljelyaineeseen. Liuottimien tai dispergointiaineiden käyttö voi olla tarpeen joissakin tapauksissa riittävän väkevän kantaliuoksen valmistamiseksi. Esimerkkejä sallituista liuottimista ovat asetoni, etanoli, metanoli, etyleeniglykolimonoetyylieetteri, etyleeniglykolidimetyylieetteri, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sallittuja dispergointiaineita ovat Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metyyliselluloosa ja HCO-40. Liuotusapuaineen pitoisuuden on oltava mahdollisimman pieni lopullisessa testiviljelyaineessa ($\leq$ 0,1 ml/l), ja sen on oltava sama kaikissa käsittelyissä. Jos käytetään liuotusapuaineita, niillä ei saa olla merkittävää vaikutusta eloonjäämiseen eikä näkyviä haitallisia vaikutuksia varhaisiin kehitysvaiheisiin. Se on osoitettava ainoastaan liuotinta sisältävän kontrollin avulla. Näiden aineiden käyttöä on kuitenkin vältettävä mahdollisimman pitkälle.

TESTISUUNNITELMA

17. ”Testisuunnitelma” tarkoittaa testipitoisuuksien lukumäärän ja pitoisuusvälien valintaa, astioiden lukumäärää kutakin pitoisuutta kohti ja toukkien lukumäärää astiaa kohti. Suunnitelmat EC-pisteen arviointia, NOEC:n määritystä ja rajatestin tekemistä varten on kuvattu. Regressioanalyysi on parempi vaihtoehto kuin hypoteesin testaus.

Regressioanalyysille suositeltava testisuunnitelma

18. Testissä käytettävien pitoisuuksien on katettava vaikutuspitoisuus (esim. EC_{15}, EC_{50}) ja se pitoisuusalue, joka on merkityksellinen kyseisen testiaineen kannalta. Tarkkuus ja etenkin luotettavuus, jolla vaikutuspitoisuuksien (EC_x) estimaatit voidaan tehdä, paranee yleensä, kun vaikutuspitoisuus

▼M4

sijoittuu testattujen pitoisuuksien alueelle. Ekstrapolointia paljon matalimman positiivisen pitoisuuden alle tai korkeimman pitoisuuden ylle on vältettävä. Alustava pitoisuusalueen määrittely voi auttaa sopivien testipitoisuuksien valinnassa (katso kohta 27).

19. Jos halutaan arvioida EC_x, jokaisesta pitoisuudesta tarvitaan vähintään viisi testipitoisuutta ja kolme rinnakkaisnäytettä. On joka tapauksessa suositeltavaa käyttää riittäviä testipitoisuuksia, jotta mallin estimointi onnistuu hyvin. Pitoisuuksien välinen kerroin ei saa olla yli kaksi (poikkeus voidaan tehdä, jos annosvastekäyrä on loiva). Käsittelyssä käytettävien toistojen määrää voidaan laskea, jos eri vasteita aiheuttavien testipitoisuuksien määrää nostetaan. Jos toistojen määrää lisätään tai testipitoisuuden välejä pienennetään, testin luottamusväli yleensä kapenee. Toistoja tarvitaan lisää, jos halutaan arvioida toukkien eloonjäänti ja kasvu 10 päivän aikana.

NOEC:n/LOEC:n estimointiin suositeltava testisuunnitelma

20. Jos halutaan arvioida LOEC tai NOEC, on käytettävä vähintään viittä testipitoisuutta ja vähintään neljää toistoa, eikä pitoisuuksien välinen kerroin saa olla yli kaksi. Toistojen määrän on oltava riittävän suuri, jotta tilastollinen voima on riittävä ja kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla ($p = 0,05$). Kehittymisnopeuteen soveltuu yleensä varianssianalyysi (ANOVA), kuten Dunnett-testi ja Williams-testi (17)(18)(19)(20). Kuoriutumisasteeseen voidaan käyttää Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferronin korjauksella) tai Mantel-Haenszelin testiä.

Rajatesti

21. Rajatesti (yksi testipitoisuus ja kontrolli) voidaan tehdä, jos alustavassa pitoisuusalueen määrityksessä ei havaittu vaikutuksia. Rajatestin tarkoituksena on osoittaa, että testiaineen toksisuusarvo on suurempi kuin testattu rajapitoisuus. Tässä testimenetelmässä ei voida suositella pitoisuutta, joten asia jätetään sääntelyviranomaisten harkittavaksi. Yleensä vähintään kuusi rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä on tarpeen. On osoitettava, että tilastollinen voima on riittävä, jotta kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla ($p = 0,05$). Jos vaste on metrinen (kehittymisnopeus ja paino), t-testi on soveltuva tilastollinen menetelmä, jos tiedot täyttävät tämän testin vaatimukset (normaalisuus, homogeeniset vaihtelut). Jos vaatimukset eivät täyty, voidaan käyttää t-testiä, jossa varianssit ovat heterogeenisia, tai parametritonta testiä, kuten Wilcoxon-Mann-Whitheyn testiä. Fisherin tarkka testi soveltuu kuoriutumisasteeseen.

MENETTELY

Altistumisolosuhteet

Vesi-sedimenttisysteemin valmistelu käyttäen vettä, johon tutkittavaa ainetta on lisätty

22. Testiastioihin lisätään sopiva määrä synteettistä sedimenttiä (katso kohdat 13–14 ja lisäys 3), jotta kerroksen paksuus on vähintään 1,5 cm. Vettä lisätään, kunnes sen syvyys on 6 cm (katso kohta 15). Sedimenttikerroksen ja veden syvyyden suhde ei saa olla yli 1:4, eikä sedimenttikerroksen paksuus saa olla yli 3 cm. Vesi-sedimenttisysteemiä on ilmastettava varovasti seitsemän päivää ennen testiorganismien lisäämistä (katso kohta 14 ja lisäys 3). Sedimentin voi peittää muovikiekolla, kun vettä kaadetaan päälle, jotta sedimentin ainesosien erottuminen ja hienon materiaalin resuspensio voidaan välttää, mutta kiekko on poistettava heti tämän jälkeen. Myös muut välineet voivat olla sopivia.

▼M4

23. Testiastiat on peitettävä (esim. lasilevyillä). Jos vettä haihtuu tutkimuksen aikana, lisää vettä, kunnes veden tilavuus on alkuperäisellä tasolla. Käytä tähän tarkoitukseen tislattua tai deionisoitua vettä, jotta suoloja ei keräydy.

Testiorganismien lisääminen

24. Neljä tai viisi päivää ennen testiorganismien lisäämistä munamassat otetaan viljelmistä ja pannaan pieniin astioihin kasvatusalustassa. Alustana voidaan käyttää kantaliuoksesta saatua kypsynyttä alustaa tai vasta valmistettua alustaa. Jälkimmäisessä tapauksessa kasvatusalustaan lisätään pieni määrä ravintoa, kuten viherlevää ja/tai muutama pisara hienoksi jauhetuista kalanruokahiutaleista saatua suodosta (katso lisäys 2). Käytä ainoastaan vastamunittuja munamassoja. Tavallisesti toukat alkavat kuoriutua muutama päivä munimisen jälkeen (*Chironomus riparius* 2–3 vrk lämpötilassa 20 °C, *Chironomus tentans* 1–4 vrk lämpötilassa 23 °C ja *Chironomus yoshimatui* 1–4 vrk lämpötilassa 25 °C), ja toukkien kasvu tapahtuu neljässä vaiheessa, joista jokainen kestää 4–8 päivää. Testissä käytetään ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkia (2–3 tai 1–4 vrk kuoriutumisen jälkeen). Sääskien kehitysvaiheen voi tarkistaa pääkapselin leveydestä (6).

25. Kaksikymmentä munatoukkaa sijoitetaan satunnaisesti tylpällä pipetillä jokaiseen testiastiaan, jossa on testiainetta sisältävää sedimenttiä ja vettä. Veden ilmastus on lopetettava, kun toukkia lisätään testiastioihin eikä sitä saa aloittaa 24 tuntiin toukkien lisäämisen jälkeen (katso kohdat 24 ja 32). Käytetyn testisuunnitelman (katso kohdat 19 ja 20) mukaisesti toukkien määrä pitoisuutta kohti on vähintään 60 EC-pisteen arviointia varten ja 80 NOEC-määritystä varten.

26. 24 tuntia toukkien lisäämisen jälkeen sedimentin päällä olevaan veteen lisätään testiainetta, ja aloitetaan kevyt ilmastus. Pieni määrä testiaineliuosta lisätään pipetillä vedenpinnan alle. Sen jälkeen sedimentin päällä oleva vesi sekoitetaan varoen häiritsemästä sedimenttiä.

Testipitoisuudet

27. Raja-annostesti voi auttaa määrittämään pitoisuusaluetta varsinaista testiä varten. Tähän tarkoitukseen käytetään testiaineen pitoisuuksia laajoin pitoisuusvälein. Jotta surviaissääskien pintatiheys on sama, jota käytetään varsinaisessa testissä, surviaissääsket altistetaan jokaiselle testiaineen pitoisuudelle siksi aikaa, että sopivat testipitoisuudet voidaan arvioida. Rinnakkaisnäytteitä ei tarvita.

28. Varsinaisessa testissä käytettävät testipitoisuudet päätetään raja-annostestin perusteella. Käytössä on oltava vähintään viisi pitoisuutta, jotka valitaan kohdissa 18 ja 20 kuvatulla tavalla.

Kontrollit

29. Testissä on käytettävä kontrolliastioita, joissa on sedimenttiä mutta ei testiainetta, ja soveltuvaa määrää rinnakkaisnäytteitä (katso kohdat 19–20). Jos testiaineen lisäyksessä on käytetty liuotinta (katso kohta 16), sedimentin liuotinkontrolli on lisättävä.

▼M4

Testijärjestelmä

30. Käytettävät järjestelmät ovat staattisia. Puolistaattisia tai läpivirtausjärjestelmiä, joissa sedimentin yläpuolinen vesi uusiutuu ajoittain tai jatkuvasti, voidaan käyttää poikkeustapauksissa, kuten jos vedenlaatu ei sovellu testiorganismille tai vaikuttaa kemialliseen tasapainoon (esim. liuenneen hapen pitoisuus laskee liian matalaksi, erityistuotteiden pitoisuus nousee liian korkeaksi tai sedimentistä uuttuu kivennäisaineita, jotka vaikuttavat pH-arvoon ja/tai veden kovuuteen). Yleensä muut sedimentin päällä olevan veden laatua kohentavat toimet, kuten ilmastus, ovat kuitenkin riittäviä ja suositeltavia.

Ravinto

31. Toukkia on ruokittava mieluiten päivittäin tai vähintään kolmesti viikossa. Riittävä määrä kalanruokaa (suspensiona vedessä tai hienoksi jauhettuna, esim. TetraMin tai TetraPhyll, lisätietoja lisäyksessä 2) on 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatui* -lajille) päivässä toukkaa kohden ensimmäisten 10 päivän aikana. Tätä vanhemmat toukat voivat tarvita vähän enemmän ruokaa: 0,5–1 mg päivässä toukkaa kohden pitäisi riittää testin loppuun saakka. Ruoan määrää pitää pienentää kaikissa käsittelyissä ja säädellä, jos sienikasvua ilmenee tai kontrolleissa esiintyy kuolleisuutta. Jos sienikasvua ei saada loppumaan, testi on toistettava. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva aine (esim. log K_{ow}>5) tai aine, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, organismien eloonjääntiin ja luontaiseen kasvuun tarvittava ravinnon määrä voidaan lisätä synteettiseen sedimenttiin ennen stabiloitumisvaihetta. Tässä tapauksessa on käytettävä kalanruoan sijaan kasviainesta, kuten 0,5 prosenttia (kuivapaino) nokkosen (*Urtica dioica*), valkomulperin (*Morus alba*), valkoapilan (*Trifolium repens*), pinaatin (*Spinacia oleracea*) tai muun kasviaineksen (*Cerophyl* tai alfaselluloosan) hienoksi jauhettuja lehtiä.

Inkubaatio-olosuhteet

32. Sedimentin päällä olevaa vettä aletaan ilmastaa varovasti mieluiten 24 tuntia toukkien lisäämisen jälkeen, ja ilmastusta jatketaan testin loppuun saakka (on pidettävä huoli, ettei liuenneen hapen pitoisuus laske alle 60 prosenttiin ilman kyllästysarvosta). Ilmastus tapahtuu lasisella Pasteur-pipetillä, joka on kiinnitetty 2–3 senttiä sedimenttikerroksen yläpuolelle (yksi tai muutama kupla sekunnissa). Haihtuvia kemikaaleja testattaessa voidaan harkita, jätetäänkö vesi-sedimenttisysteemi ilmastamatta.

33. Testi tehdään vakiolämpötilassa 20 °C (± 2 °C). Suositeltu lämpötila *C. tentans* -lajille on 23 °C (± 2 °C) ja *C. yoshimatui* -lajille 25 °C (± 2 °C). Valoisa aika on 16 tuntia, ja valon voimakkuuden pitää olla 500–1 000 luksia.

Altistuksen kesto

34. Altistus alkaa, kun toukat lisätään astioihin, joissa on testiainetta, ja kontrolliastioihin. Altistuksen enimmäiskesto on 28 vuorokautta lajeille *C. riparius* ja *C. yoshimatsui*, ja 65 vuorokautta lajille *C. tentans*. Jos sääsket kuoriutuvat aikaisemmin, testi voidaan lopettaa vähintään viisi päivää sen jälkeen, kun viimeinen surviaissääski on kasvanut täysikasvuiseksi kontrollissa.

HAVAINNOT

Kuoriutuminen

35. Kehitysaika ja täysin kuoriutuneiden uros- ja naarassääskien yhteismäärä määritetään. Urokset tunnistaa helposti sulkamaisista tuntosarvista.

▼M4

36. Testiastioita on tarkkailtava vähintään kolmesti viikossa ja epänormaalia käyttäytymistä on arvioitava silmämääräisesti (esim. sedimentistä poistuminen, epätavallinen uinti) kontrolliin verrattuna. Sääsket on laskettava päivittäin, kun kuoriutuminen on odotettavissa. Täysikasvuisten sääskien sukupuoli ja lukumäärä kirjataan päivittäin. Tunnistuksen jälkeen sääsket poistetaan astioista. Ennen testin loppua mahdollisesti munitut munamassat on kirjattava ylös ja poistettava, jottei sedimenttiin tule lisää toukkia. Myös niiden näkyvissä olevien koteloiden määrä, jotka eivät ole kuoriutuneet, on merkittävä ylös. Kuoriutumisen mittausohjeet ovat lisäyksessä 5.

Kasvu ja eloonjääntı

37. Jos tiedot 10 vuorokauden toukkien eloonjäännistä ja kasvusta tarvitaan, testin alussa on otettava käyttöön ylimääräisiä testiastioita myöhempää käyttöä varten. Toukat seulotaan ylimääräisten astioiden sedimentistä 250 µm:n seulalla. Kuolleiksi lasketaan toukat, jotka eivät liiku tai reagoi mekaanisiin ärsykkeisiin. Myös ne toukat, joita ei otettu talteen, lasketaan kuolleiksi (mikrobit ovat saattaneet hajottaa testin alussa kuolleet toukat). Eloonjääneiden toukkien (tuhkaton) kuivapaino testiastiaa kohden määritetään ja yksilön keskimääräinen kuivapaino astiassa lasketaan. On hyödyllistä määrittää, missä kehitysvaiheessa eloonjääneet toukat ovat. Tähän tarkoitukseen voidaan mitata kunkin toukan pääkapselin leveys.

Mittaukset

Testiaineen pitoisuus

38. Vähintään sedimentin päällä olevan veden, huokosveden ja sedimentin näytteet analysoidaan testin alussa (mieluiten yksi tunti testiaineen lisäämisen jälkeen) ja lopussa suurimmassa pitoisuudessa ja matalammassa pitoisuudessa. Testiaineen pitoisuudesta saadaan tietoa testiaineen käyttäytymisestä ja jakautumisesta vesi-sedimenttisysteemissä. Sedimenttinäytteen ottaminen testin alussa voi vaikuttaa testijärjestelmään (esim. testitoukkia poistuu), joten testin alussa ja testin aikana tehtäviä analyyttisiä määrityksiä varten on tarvittaessa käytettävä ylimääräisiä testiastioita (katso kohta 39). Sedimentin mittaukset eivät välttämättä ole tarpeen, jos testiaineen jakautuminen veden ja sedimentin välille on määritetty selkeästi vesi/sedimentti-tutkimuksessa vastaavissa olosuhteissa (esim. sedimentin ja veden suhde, sovelluksen tyyppi, orgaanisen hiilen pitoisuus sedimentissä).

39. Jos välimittauksia tehdään (esim päivänä 7) ja analyysiin tarvitaan suuria näytteitä, joiden ottaminen testiastioista vaikuttaisi testijärjestelmään, analyyttisiin määrityksiin käytetään ylimääräisistä testiastioista otettuja näytteitä. Näitä astioita käsitellään samalla tavoin kuin testiastioita (mukaan lukien testiorganismien lisääminen), mutta niitä ei käytetä biologiseen havainnointiin.

40. Huokosveden suositeltava eristystapa on sentrifugointi (esim. 10 000 g ja 4 °C 30 minuutin ajan). Jos on kuitenkin osoitettu, että testiaine ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää. Joskus pitoisuuksien analysointi huokosvedestä ei ole mahdollista, koska näyte on liian pieni.

▼M4

Fysikaalis-kemialliset parametrit

41. Testiastioiden pH ja lämpötila sekä testiveteen liuennut happi on mitattava asiaankuuluvasti (katso kohta 10). Kovuus ja ammoniakki on mitattava kontrolliastioissa ja yhdessä testiastiassa suurimmalla pitoisuudella testin alussa ja lopussa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

42. Tämän testin tarkoituksena on määrittää testiaineen vaikutus uros- ja naarassääskien kehittymisnopeuteen ja täysin kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärään. 10 päivän testissä määritetään vaikutukset toukkien eloonjääntiin ja painoon. Jos eri sukupuolten herkkyydessä ei ilmene tilastollisesti merkitsevää eroa, urosten ja naaraiden tulokset voidaan yhdistää tilastollisia analyysejä varten. Sukupuolten väliset herkkyyserot voidaan määrittää tilastotieteellisesti esimerkiksi χ^2-r × 2 -taulukkotestillä. Toukkien eloonjäänti ja yksilön keskimääräinen kuivapaino astiaa kohden määritetään 10 päivän kuluttua, jos tarpeen.

43. Vaikutuspitoisuudet ilmaistaan pitoisuuksina sedimentin päällä olevassa vedessä, ja vaikutuspitoisuudet lasketaan mieluiten testin alussa mitattujen sedimenttipitoisuuksien perusteella (katso kohta 38).

44. EC_{50}:n tai minkä tahansa muun EC_x:n piste-estimaattia laskettaessa astiakohtaisia tilastotietoja voidaan käyttää aitoina toistoina. Laskettaessa minkä tahansa EC_x-arvon luottamusväliä astioiden välinen vaihtelu on otettava huomioon tai vaihtoehtoisesti osoitettava vaihtelu niin pieneksi, että se voidaan jättää huomiotta. Jos malliin sovelletaan pienimmän neliösumman menetelmää, astiakohtaisiin tilastotietoihin on sovellettava muunnosta, jotta varianssin homogeenisuus paranee. EC_x-arvot on kuitenkin laskettava sen jälkeen, kun vaste on muunnettu takaisin alkuperäisarvoon.

45. Kun NOEC/LOEC on tarkoitus määrittää tilastollisen hypoteesin testillä, astioiden välinen vaihtelu on huomioitava esimerkiksi hierarkkisella ANOVAlla. Robustimpia testejä (21) voidaan käyttää soveltuvissa tilanteissa, kun tavalliset ANOVAn oletukset eivät täyty.

Kuoriutumisaste

46. Kuoriutumisasteet ovat dikotomisia tietoja, ja ne voidaan analysoida Cochran-Armitagen testillä, jota sovelletaan alaspäin askeltavasti, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa, ja näitä tietoja pidetään tämän odotuksen mukaisina. Jos näin ei ole, voidaan käyttää Fisherin tarkkaa testiä tai Mantel-Haenszelin testiä, jossa p-arvot on korjattu Bonferroni-Holmin menetelmällä. Jos on näyttöä siitä, että saman pitoisuuden toistojen välinen varianssi on suurempi kuin binomijakauma antaa edellyttää (ylihajonta), voidaan käyttää Cochran-Armitagen testiä tai Fisherin tarkkaa testiä (21).

47. Kuoriutuneiden sääskien määrä astiassa (n_e) määritetään, ja summa jaetaan lisättyjen sääskien määrällä (n_a):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

jossa:

ER = kuoriutumisaste

n_e = kuoriutuneiden sääskien määrä astiassa

n_a = astiaan lisättyjen toukkien määrä

48. Kun näytekoko on suuri ja ylihajontaa esiintyy, paras vaihtoehto on pitää kuoriutumisastetta jatkuvana vasteena ja käyttää esimerkiksi Williamsin testiä, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa ja yhdenmukainen kuoriutumisastetietojen kanssa. Dunnettin testi soveltuu, kun monotonisuutta ei esiinny. Näytekoko määritetään tässä suureksi, jos sekä kuoriutuneiden että kuoriutumattomien toukkien määrä on toistossa (astiassa) yli viisi.

49. Jos halutaan soveltaa ANOVA-menetelmiä, ER-arvot on ensin muunnettava arcsin-neliöjuuri-muunnoksella tai Freeman-Tukeyn muunnoksella, jotta saadaan likimääräinen normaalijakauma ja varianssi tasoittuu. Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferroni) tai Mantel-Haenszelin testiä voidaan soveltaa, kun käytetään absoluuttisia frekvenssejä. Arcsin-neliöjuuri-muunnosta sovelletaan ottamalla kuoriutumisasteen neliöjuuren käänteinen sini ($sini^{-1}$).

50. Kuoriutumisasteissa EC_x-arvot lasketaan käyttämällä regressioanalyysiä (tai esim. probit- (22), logit- tai Weibull-mallia tai soveltuvaa kaupallista ohjelmistoa). Jos regressioanalyysi epäonnistuu (esim. osittaisia vasteita on alle kaksi), käytetään muita parametrittomia menetelmiä, kuten liukuvaa keskiarvoa tai yksinkertaista interpolaatiota.

Kehittymisnopeus

51. Keskimääräinen kehittymisaika edustaa keskimääräistä ajanjaksoa toukkien lisäämisestä (testipäivä 0) kokeellisen sääskikohortin kuoriutumiseen. (Aidon kehittymisajan laskennassa on huomioitava toukkien ikä lisäyshetkellä.) Kehittymisnopeus on kehittymisajan käänteisluku (yksikkö: 1/vrk) ja edustaa päivässä tapahtuvaa toukkien kehittymistä. Kehittymisnopeuden käyttö on suositeltavaa näiden sedimentin toksisuuskokeiden arvioinnissa, sillä sen varianssi on pienempi ja se on homogeenisempi ja lähempänä normaalijakaumaa kuin kehittymisaika. Siksi tehokkaita parametritestimenetelmiä käytetään mieluummin kehittymisnopeuden kuin kehittymisajan kanssa. Kun kehittymisnopeus on jatkuva vaste, EC_x-arvot voidaan estimoida regressioanalyysillä (esim. (23) ja (24)).

52. Seuraavissa tilastollisissa testeissä oletetaan, että tarkastuspäivänä x havaittu sääskimäärä kuoriutuu päivän x ja päivän x-l välissä (l = tarkastusvälin pituus, yleensä 1 päivä). Keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa (x) lasketaan seuraavasti:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

jossa:

$\bar{x}$: keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa

i: tarkastusvälin indeksi

m: tarkastusvälien enimmäismäärä

▼M4

f_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien määrä

n_e: testin lopussa kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärä ($=\sum f_i$)

x_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien kehittymisnopeus

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

jossa:

day_i: tarkastuspäivä (päivää lisäyksen jälkeen)

l_i: tarkastusvälin i pituus (päivissä, yleensä 1 päivä)

Testiraportti

53. Testiraportin on sisällettävä vähintään seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (vesiliukoisuus, höyrynpaine, jakaantumiskerroin maa-aineksessa (tai sedimentissä, jos saatavissa), stabiilisuus vedessä jne.)

— kemialliset tunnistetiedot (yleisnimi, kemiallinen nimi, rakennekaava, CAS-numero jne.) sekä puhtaus ja testiaineen kvantifioinnissa käytetty analyysimenetelmä.

Testilajit:

— käytetyt koe-eläimet: lajit, tieteellinen nimi, eliöiden lähde ja kasvatusolosuhteet

— tiedot munamassojen ja toukkien käsittelystä

— koe-eläinten ikä testiastioihin lisättäessä.

Testiolosuhteet:

— käytetty sedimentti, eli luonnollinen vai synteettinen sedimentti

— luonnollisen sedimentin osalta sedimentin näytteenottopaikan sijainti ja kuvaus, mukaan lukien, jos mahdollista, kontaminaatiohistoria, ominaisuudet: pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, C/N-suhde ja rakeisuus (tarvittaessa)

— synteettisen sedimentin valmistus: ainesosat ja niiden ominaisuudet (orgaanisen hiilen pitoisuus, pH, kosteus jne. testin alussa)

— testiveden valmistus (jos käytetään synteettistä vettä) ja ominaisuudet (happipitoisuus, pH, johtavuus, kovuus jne. testin alussa)

— sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys

— sedimentin päällä olevan veden ja huokosveden tilavuus, märän sedimentin paino huokosveden kanssa ja ilman huokosvettä

— testiastiat (materiaali ja koko)

— kantaliuosten valmistusmenetelmät ja testipitoisuudet

▼M4

— testiaineen lisääminen: käytetyt testipitoisuudet, toistojen määrä ja mahdollisen liuottimen käyttö

— inkubaatio-olosuhteet: lämpötila, valojakso ja valon voimakkuus, ilmastus (taajuus ja voimakkuus)

— yksityiskohtaiset tiedot syöttämisestä, kuten ravinnon tyyppi, valmistus, määrä ja syöttöaikataulu.

Tulokset:

— kaikki nimelliset testipitoisuudet, mitatut testipitoisuudet ja tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritettiin testiaineen pitoisuus testiastiassa

— testiastioissa olevan veden laatu, eli pH, lämpötila, liuennut happi, kovuus ja ammoniakki

— mahdollinen haihtuneen testiveden korvaus

— kuoriutuneiden uros- ja naarassääskien määrä astiassa päivää kohden

— kuoriutumattomien toukkien määrä astiassa

— toukkien keskimääräinen kuivapaino astiaa kohden, kehitysasteittain jos tarpeen

— kuoriutumisprosentti rinnakkaisnäytteessä ja testipitoisuudessa (uros- ja naarassääsket yhteensä)

— täysin kuoriutuneiden sääskien keskimääräinen kehittymisnopeus rinnakkaisnäytteessä ja testissä (uros- ja naarassääsket yhteensä)

— toksisten tutkittavien ominaisuuksien estimaatit, kuten EC_x (ja siihen liittyvät luottamusvälit), NOEC ja/tai LOEC, ja niiden määrittämiseen käytetyt tilastolliset menetelmät

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼**M4**

7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8) US-EPA/OPPTS 850,1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14) Tämän liitteen luku C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla.

15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096–1121.

18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103–117.

20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.

21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

Synteettinen sedimentti on luonnollisen sedimentin fyysisiä ainesosia jäljittelevistä materiaaleista valmistettu seos.

Yläpuolinen vesi on testiastiassa sedimentin päällä oleva vesi.

Huokosvesi on sedimenttirakeiden välissä olevaa vettä.

Vesi, johon on lisätty testiaine.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

Lisäys 2

***Chironomus riparius* -lajin kasvatussuosituksia**

1. *Chironomus*-toukkia voi kasvattaa kiteytysmaljoissa tai suurissa astioissa. Astian pohjalle levitetään noin 5–10 mm:n paksuinen kerros hienoa kvartsihiekkaa. Myös piimaa (esim. Merck, tuotenro 8117) on osoitettu soveltuvaksi substraatiksi (ohuempi, enintään muutaman millimetrin paksuinen kerros riittää). Sen jälkeen lisätään monta senttiä soveltuvaa vettä. Jos haihtumista tapahtuu, kuivuminen on estettävä lisäämällä vettä tarvittaessa. Vesi voidaan vaihtaa tarvittaessa. Varovainen ilmastus on tarpeen. Toukkien kasvatusastioita on säilytettävä soveltuvassa häkissä, jotta kuoriutuvat aikuiset eivät pääse pakenemaan. Häkin on oltava tarpeeksi tilava, jotta kuoriutuneet aikuiset mahtuvat parveilemaan. Muutoin parittelua ei välttämättä tapahdu (vähimmäiskoko on n. 30 × 30 × 30 cm).

2. Häkkejä säilytetään huoneenlämmössä tai huoneessa, jonka lämpötila on vakioitu (20 ± 2 °C). Valoisa jakso on 16 tuntia (voimakkuus n. 1 000 luksia), pimeys 8 tuntia. On ilmoitettu, että lisääntyminen voi estyä, jos ilman suhteellinen kosteus on alle 60 prosenttia.

Laimennusvesi

3. Mitä tahansa soveltuvaa luonnollista tai synteettistä vettä voidaan käyttää. Kaivovesi, talousvesi, josta on poistettu kloori, ja keinotekoinen neste (esim. Elendtin ”M4”- tai ”M7”-liuos, ks. jäljempänä) ovat yleisesti käytettyjä. Vesi on ilmastettava ennen käyttöä. Kasvatusvesi voidaan tarvittaessa uusia kaatamalla tai lappamalla käytetty vesi kasvatusastioista varoen tuhoamasta toukkaputkia.

Toukkien ruokinta

4. *Chironomus*-toukat ruokitaan kalojen hiutaleruoalla (TetraMin®, TetraPhyll® tai muu vastaava kaupallinen kalanruoka), jota annetaan noin 250 mg astiaa kohden päivässä. Ruoka voidaan antaa kuivana jauheena tai suspensiona vedessä: 1,0 g hiutaleruokaa lisätään 20 ml:aan laimennusvettä ja seos sekoitetaan homogeeniseksi. Tätä valmistetta voi antaa noin 5 ml astiaa kohden päivässä (ravista ennen käyttöä). Vanhoille toukille voi antaa enemmän ruokaa.

5. Ruokkimista säädellään vedenlaadun mukaan. Jos kasvatusalusta muuttuu sameaksi, ravinnon määrää on vähennettävä. Ravinnon määrän lisäämistä on seurattava tarkasti. Jos ravintoa on liian vähän, toukat siirtyvät kohti vesipatsasta, ja jos ravintoa on liian paljon, mikrobien toiminta voi lisääntyä ja happipitoisuudet laskea. Kumpikin vaihtoehto voi laskea kasvunopeutta.

6. Vähän viherlevän (esim. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) soluja voidaan lisätä, kun uusia kasvatusastioita perustetaan.

Kuoriutuneiden aikuisten ruokinta

7. Eräät kokeen suorittajat ovat ehdottaneet, että kylläisessä sakkaroosiliuoksessa liotettu vanutuppo saattaa riittää kuoriutuneiden aikuisten ravinnoksi.

▼M4

Kuoriutuminen

8. Kun lämpötila on 20 ± 2 °C, toukkien kasvatusastioista alkaa kuoriutua aikuisia noin 13–15 päivän kuluttua. Urokset tunnistaa helposti sulkamaisista tuntosarvista.

Munamassat

9. Kun kasvatushäkissä on aikuisia, kaikista toukkien kasvatusastioista on tarkistettava kolme kertaa viikossa, onko niissä hyytelömäisiä munamassoja. Jos munamassoja on, ne on poistettava varovasti. Ne siirretään pieneen astiaan, jossa on pieni määrä kasvatusvettä. Munamassoja voi käyttää uuden viljelyastian perustamiseen (esim. 2–4 munamassaa astiaa kohden) tai toksisuustesteihin.

10. Munatoukkien pitäisi kuoriutua 2–3 päivän kuluttua.

Uusien viljelyastioiden perustaminen

11. Kun viljelmät on perustettu, uuden toukkaviljelyastian voi aloittaa testivaatimusten mukaan kerran viikossa tai harvemmin. Vanhat astiat poistetaan, kun aikuiset sääsket ovat kuoriutuneet. Näin saadaan säännöllisesti aikuisia mahdollisimman vähäisellä vaivalla.

Testiliuosten ”M4” ja ”M7” valmistus

12. Elendt (1990) kuvasi ”M4”-liuoksen. ”M7”-liuos valmistetaan samoin kuin ”M4” lukuun ottamatta taulukossa 1 merkittyjä aineita, joiden pitoisuus on neljä kertaa pienempi ”M7”-liuoksessa kuin ”M4”-liuoksessa. ”M7”-liuosta koskeva julkaisu on valmisteilla (Elendt, henkilökohtainen viesti). Testiliuosta ei valmisteta Elendtin ja Biasin mukaan (1990), sillä kantaliuosten valmistusta varten annetut $NaSiO_3$-, 5 H_2O-, $NaNO_3$-, KH_2PO_4- ja K_2HPO_4-pitoisuudet eivät ole riittäviä.

”M7”-liuoksen valmistus

13. Jokainen kantaliuos (I) valmistetaan erikseen, ja näistä kantaliuoksista (I) valmistetaan yhdistetty kantaliuos (II) (katso taulukko 1). ”M7”-liuos valmistetaan täyttämällä 50 millilitraa yhdistettyä kantaliuosta (II) ja taulukossa 2 annetut määrät jokaista makroravinteiden kantaliuosta 1 litraksi deionisoitua vettä. Vitamiinien kantaliuos valmistetaan lisäämällä deionisoituun veteen kolmea vitamiinia taulukon 3 mukaisesti, ja 0,1 millilitraa yhdistettyä vitamiinien kantaliuosta lisätään lopulliseen ”M7”-liuokseen vähän ennen käyttöä. (Vitamiinien kantaliuos säilytetään jäädytettynä pienissä erissä.) Liuos ilmastetaan ja stabiloidaan.

Taulukko 1

Hivenaineiden kantaliuokset M4- ja M7-liuosta varten

Kantaliuokset (I)	Määrä (mg), joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä	Yhdistetyn kantaliuoksen (II) valmistus: Sekoita seuraavat määrät (ml) kantaliuoksia (I) ja täytä 1 litraksi deionisoitua vettä		Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Kantaliuokset (I)	Määrä (mg), joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä	Yhdistetyn kantaliuoksen (II) valmistus: Sekoita seuraavat määrät (ml) kantaliuoksia (I) ja täytä 1 litraksi deionisoitua vettä		Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Nämä aineet ovat erilaiset M4- ja M7-liuoksissa, kuten edellä kerrottiin.
(2) Nämä liuokset valmistetaan erikseen. Sitten ne kaadetaan yhteen ja käsitellään välittömästi autoklaavissa.

Taulukko 2

Makroravinteiden kantaliuokset M4- ja M7-liuosta varten

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn makroravinteiden kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Taulukko 3

Vitamiinien kantaliuos M4- ja M7-liuosta varten

Kaikki kolme vitamiiniliuosta yhdistetään yhdeksi vitamiinien kantaliuokseksi.

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn vitamiinien kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinihydrokloridi	750	0,1	0,075
Syaanikobalamiini (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiini	7,5	0,1	0,00075

KIRJALLISUUSVIITTEET

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

Lisäys 3

SYNTEETTISEN SEDIMENTIN VALMISTUS

Sedimentin koostumus

Synteettisen sedimentin koostumuksen on oltava seuraavanlainen:

Ainesosa	Ominaisuudet	Prosenttiosuus sedimentin kuivapainosta
Turve	Rahkasuoturvetta, pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0, ei näkyviä kasvijäänteitä, hienoksi jauhettuna (hiukkaskoko ≤ 1 mm) ja ilmakuivattuna	4–5
Kvartsihiekka	Raekoko: > 50 prosenttia hiukkasista on oltava kokoa 50–200 μm	75–76
Kaoliniittisavi	Kaoliniittipitoisuus ≥ 30 %	20
Orgaaninen hiili	Säädetään lisäämällä turvetta ja hiekkaa	2 (± 0,5)
Kalsiumkarbonaatti	$CaCO_3$, jauhettu, kemiallisesti puhdas	0,05–0,1
Vesi	Johtavuus ≤ 10 μS/cm	30–50

Valmistelut

Turve ilmakuivataan ja jauhetaan hienoksi. Tarvittava määrä turvejauhetta suspendoidaan deionisoituun veteen käyttämällä tehokasta homogenisointilaitetta. Suspension pH-arvoksi säädetään 5,5 ± 0,5 $CaCO_3$:lla. Suspension annetaan vakioitua vähintään kahden päivän ajan sekoittamalla sitä varovasti lämpötilassa 20 ± 2 °C, jotta pH stabiloituu ja saadaan stabiili mikrobikomponentti. Sen jälkeen pH mitataan uudelleen. Arvon pitäisi olla 6,0 ± 0,5. Sen jälkeen turvesuspensioon sekoitetaan muut ainesosat (hiekka ja kaoliniittisavi) ja deionisoitu vesi, jotta saadaan homogeenistä sedimenttiä, jonka vesipitoisuus on 30–50 prosenttia sedimentin kuivapainosta. Lopullisen seoksen pH mitataan vielä kerran, ja se säädetään tarvittaessa $CaCO_3$:lla alueelle 6,5–7,5. Sedimentistä otetaan näytteitä, joista määritetään kuivapaino ja orgaanisen hiilen pitoisuus. On suositeltavaa, että synteettistä sedimenttiä sopeutetaan ennen chironomid-eliöillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat.

Säilytys

Synteettisen sedimentin kuivia ainesosia voi säilyttää kuivassa ja viileässä paikassa huoneenlämmössä. Valmistettua (märkää) sedimenttiä ei saa säilyttää ennen käyttöä tässä testissä. Se on käytettävä heti valmistuksen lopussa olevan 7 päivän sopeutusajan jälkeen.

KIRJALLISUUSVIITTEET:

Tämän liitteen luku C.8. Myrkyllisyystutkimus madoilla.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

Lisäys 4

Hyväksyttävän laimennusveden kemialliset ominaisuudet

Aine	Pitoisuudet
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 µg/l
Kovuus $CaCO_3$:na	< 400 mg/l (*)
Jäännöskloori	< 10 mg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

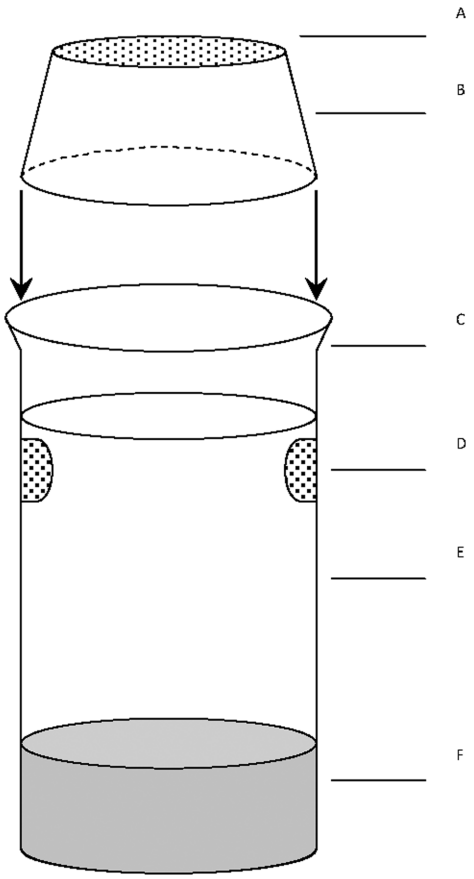
(*) Jos kovuusionien ja testiaineen välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä).

▼**M4**

Lisäys 5

Chironomid-toukkien kuoriutumisen tarkkailuohjeet

Dekantterilaseihin asetetaan pyydykset kuoriutuneita toukkia varten. Näitä pyydyksiä tarvitaan päivästä 20 lähtien testin loppuun saakka. Alla on esimerkki käytetystä pyydyksestä:



A: polyamidiverkko

B: ylösalaisin käännetyt muovikupit

C: reunukseton altistusdekantterilasi

D: verkkoaukot vedenvaihtoa varten

E: vettä

F: sedimentti

▼M4

C.29 **BIOHAJOAVUUS – CO_2 SULJETUISSA ASTIOISSA (HEADSPACE-TESTI)**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 310 (2006). Testimenetelmällä voidaan arvioida kemikaalien biohajoavuutta, ja sen avulla saadaan vastaavaa tietoa kuin tämän liitteen luvussa C.4, A–F kuvatuilla kuudella testimenetelmällä. Niinpä kemikaalia, jonka tulokset ovat positiiviset tässä testimenetelmässä, voidaan pitää helposti biohajoavana, eli se hajoaa nopeasti ympäristössä.

2. Vakiintunut hiilidioksidimenetelmä (CO_2) (1), joka perustuu Sturmin alkuperäiseen testiin (2) ja jolla arvioidaan orgaanisten kemikaalien biohajoavuutta mittaamalla mikrobien toiminnan tuloksena syntyvää hiilidioksidia, on tavallisesti ensimmäinen vaihtoehto, kun testataan heikosti liukenevia ja voimakkaasti adsorboivia kemikaaleja. Sitä käytetään myös liukeneville (mutta ei haihtuville) kemikaaleille, sillä monet pitävät hiilidioksidin muodostumista ainoana pitävänä todisteena mikrobien toiminnasta. Liuenneen orgaanisen hiilen poistumista voivat aiheuttaa fyysis-kemialliset prosessit – adsorptio, haihtuminen, saostuminen, hydrolyysi – sekä mikrobien toiminta, ja monet ei-biologiset reaktiot kuluttavat happea. Orgaaniset kemikaalit harvoin tuottavat hiilidioksidia abioottisesti. Alkuperäisessä ja muunnetussa Sturmin testissä (1)(2) CO_2:ta poistetaan nestefaasista absorboiviin astioihin kuplittamalla (sparging) eli hiilidioksidia poistetaan kuplittamalla ilmaa nestefaasin läpi. Larsonin versiossa (3)(4) CO_2 siirretään puolestaan reaktioastiasta absorboiviin materiaaleihin kuljettamalla hiilidioksidia sisältämätöntä ilmaa kaasutilan (headspace) läpi ja lisäksi ravistamalla testiastiaa jatkuvasti. Ainoastaan Larsonin muunnoksessa reaktioastiaa ravistetaan. Liukenemattomia aineita sekoitetaan standardissa ISO 9439 (5) ja alkuperäisessä yhdysvaltalaisessa versiossa (6), joissa kummassakin käytetään kuplitusta (sparging) kaasutilan vaihdon sijaan. Toisessa virallisessa US EPA -menetelmässä (7), joka perustuu Gledhillin menetelmään (8), ravistettu reaktioastia suljetaan ilmatiiviisti, ja tuotettu CO_2 sidotaan astiassa olevaan emäkseen suoraan kaasufaasista, kuten klassisissa Warburgin/Barcroftin respirometripulloissa.

3. On kuitenkin osoitettu, että epäorgaaninen hiili (IC) kerääntyy standardin Sturmin muunnetun testin aikana väliaineessa useisiin kemikaaleihin (9). Epäorgaanisen hiilen pitoisuus oli jopa 8 mg/l aniliinin (20 mg C/l) hajoamisen aikana. Siten CO_2:n sitominen emäkseen ei antanut oikeaa kuvaa siitä, miten paljon CO_2:ta tuotettiin mikrobiologisesti hajoamisen aikana. Tästä syystä vaatimus, että > 60 prosenttia $ThCO_2$:sta on kerättävä 10-päiväisen jakson aikana (10 %:n hajoamistason saavuttamista seuraavat 10 päivää), jotta testikemikaali voidaan luokitella helposti biohajoavaksi, ei täyty joidenkin sellaisten kemikaalien osalta, jotka määriteltäisiin helposti biohajoaviksi DOC-poistuman perusteella.

4. Kun hajoamisprosentti on alempi kuin odotettu arvo, epäorgaanista hiiltä saattaa kerääntyä testiliuokseen. Silloin hajoavuutta voidaan arvioida muilla nopean biohajoavuuden testeillä.

▼M4

5. Sturmin menetelmän muiden heikkouksien (vaivalloinen, aikaa vievä, alttiimpi koevirheille eikä sovellu haihtuville kemikaaleille) vuoksi oli aiemmin alettu etsiä Gledhillin tekniikan lisäksi toista suljetun astian menetelmää läpivirtausjärjestelmien (10)(11) sijaan. Boatman *et al* (12) tarkastelivat aiempia menetelmiä ja ottivat käyttöön suljetun kaasutilan järjestelmän, jossa CO_2 vapautetaan kaasutilaan inkubaation jälkeen happamoittamalla väliaine. CO_2 mitattiin kaasukromatografisella (GC)/IC-analyysillä automaattisesti kaasutilasta otetuista näytteistä, mutta nestefaasin liuennutta epäorgaanista hiiltä (DIC) ei huomioitu. Lisäksi käytetyt astiat olivat hyvin pieniä (20 ml) ja niissä oli vain 10 ml:aa väliainetta, mikä aiheutti ongelmia esimerkiksi, kun liukenemattomia testikemikaaleja lisättiin hyvin pieniä määriä. Lisäksi siirrostetussa liuoksessa ei välttämättä ole ollenkaan tai tarpeeksi mikro-organismeja, jotka pystyvät hajottamaan testikemikaaleja.

6. Nämä vaikeudet voitettiin Struijsin ja Stoltenkampin (13) sekä Birchin ja Fletcherin (14) itsenäisissä tutkimuksissa. Jälkimmäiset saivat inspiraation anaerobisen biohajoavuuden testissä käytetystä laitteesta (15). Ensimmäisessä menetelmässä (13) CO_2 mitataan kaasutilassa happamoittamisen ja tasapainottumisen jälkeen, kun taas jälkimmäisessä (14) DIC mitataan sekä kaasu- että nestefaasissa, ilman käsittelyä. Yli 90 prosenttia muodostuneesta IC:stä oli nestefaasissa. Kummassakin menetelmässä on etunsa Sturmin testiin verrattuna, sillä niissä testijärjestelmä on pienempi ja helpompi käsitellä, haihtuvia kemikaaleja voidaan testata ja mahdollinen viive tuotetun CO_2:n mittauksessa vältetään.

7. Nämä kaksi lähestymistapaa yhdistettiin ISO Headspace CO_2 -standardissa (16), joka rengastestattiin (17). Nykyinen testimenetelmä perustuu juuri tähän standardiin. Noita kahta lähestymistapaa on käytetty myös US EPA -menetelmässä (18). CO_2:n mittaamiseen suositellaan kahta menetelmää eli CO_2 kaasutilassa happamoittamisen jälkeen (13) ja IC nestefaasissa emäksisen aineen lisäämisen jälkeen. Jälkimmäisen menetelmän otti käyttöön Peterson, kun tälle Headspace-menetelmälle, joka oli muunnettu luontaisen biohajoavuuden mittausta varten, tehtiin laboratorioiden välinen CONCAWE-tutkimus (19). Tähän testimenetelmään on sisällytetty muutokset, jotka tehtiin vuonna 1992 (20) tämän liitteen lukuun C.4 Biohajoavuuden määritys, joten olosuhteet (väliaine, kesto jne.) ovat muuten samat kuin muutetussa Sturmin testissä (20). Birch ja Fletcher (14) ovat osoittaneet, että tällä Headspace-testillä saatiin samoilla kemikaaleilla hyvin samankaltaisia tuloksia kuin tarkistettujen testimenetelmien OECD:n yhteistutkimuksissa (21).

TESTIN PERIAATE

8. Testikemikaali (tavallisesti 20 mg C/l), joka on ainoa hiilen ja energia lähde, inkuboidaan puskuri-mineraalisuolaliuoksessa, johon on siirrostettu sekapopulaatiosta otettuja mikroeliöitä. Testi tehdään suljetuissa pulloissa, joissa on ylätilassa ilmaa, joka toimii happivarastona aerobista biohajoamista varten. Testikemikaalin lopullisen aerobisen biohajoamisen tuottama CO_2 määritetään mittaamalla, kuinka paljon enemmän epäorgaanista hiiltä muodostuu testipulloissa verrattuna pulloihin, joissa on vain siirrostettua liuosta. Biohajoaminen ilmaistaan ThIC-arvona, joka perustuu alun perin lisätyn testikemikaalin (orgaanisena hiilenä) määrään.

9. DOC-poistuma ja/tai testikemikaalin primäärisen biohajoamisen laajuus voidaan myös mitata (20).

▼M4

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

10. Testikemikaalin orgaanisen hiilen pitoisuuden (% w/w) on oltava tiedossa kemiallisen rakenteen tai mittauksen perusteella, jotta hajoamisprosentti voidaan laskea. Jos testikemikaalit ovat haihtuvia, mitattu tai laskettu Henryn lain vakio auttaa määrittämään soveltuvan kaasutilan ja nestetilavuuden suhteen. Testikemikaalin toksisuus mikro-organismeille on hyvä olla tiedossa, kun valitaan soveltuvaa testipitoisuutta ja tulkitaan heikosta biohajoavuudesta kertovia tuloksia. Inhibitiota on suositeltavaa kontrolloida, ellei olet tiedossa, että testikemikaali ei estä mikrobien toimintaa (katso kohta 24).

MENETELMÄN SOVELTUVUUS

11. Tätä testiä voidaan soveltaa vesiliukoisiin ja liukenemattomiin testikemikaaleihin, mutta testikemikaalin hyvä dispersio on varmistettava. Kun käytetään suositeltua kaasutilan ja nestetilavuuden välistä suhdetta 1:2, voidaan testata haihtuvia kemikaaleja, joiden Henryn lain vakio on enintään 50 Pa m^3 mol^{-1}, sillä testikemikaalin osuus kaasutilassa ei ole yli 1 prosenttia (13). Kaasutilan tilavuuden on oltava pienempi, kun testataan tätä haihtuvampia kemikaaleja, mutta niiden biologinen hyötyosuus voi asettaa rajoituksia varsinkin, jos ne liukenevat heikosti veteen. Käyttäjien on kuitenkin valittava kaasutilan ja nestetilavuuden suhde sekä testikemikaalin pitoisuus siten, että happi riittää täydelliseen aerobiseen biohajoamiseen (esimerkiksi suuren substraattipitoisuuden ja pienen kaasutilavuuden käyttöä on vältettävä). Ohjeet ovat kirjallisuusviitteissä (13)(23).

VERTAILUKEMIKAALIT

12. Testimenetelmän toimivuus tarkistetaan testaamalla rinnakkaisesti vertailukemikaalia, jonka biohajoavuus on tiedossa. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää aniliinia, natriumbentsoaattia tai etyleeniglykolia, kun testataan vesiliukoisia kemikaaleja, ja 1-oktanolia, kun testataan heikosti liukenevia kemikaaleja (13). Näiden kemikaalien biohajoavuuden täytyy olla > 60 % ThIC 14 päivän kuluessa.

TOISTETTAVUUS

13. Menetelmän ISO-yhteistutkimuksessa (17) saatiin seuraavat tulokset, kun käytettiin suositeltuja olosuhteita ja hiilen pitoisuus testikemikaalissa oli 20 mg C/l.

Testikemikaali	Biohajoavuuden keskiarvo (28 vrk)	Variaatiokerroin (%)	Laboratorioiden määrä
Aniliini	90	16	17
1-oktanoli	85	12	14

Testin sisäinen variaatio (toistettavuus) oli pieni, kun käytettiin aniliinia. Variaatiokerroin oli enintään 5 prosenttia lähes kaikissa testiajoissa. Kahdessa tapauksessa toistettavuus oli huonompi, ja suurempi variaatio johtui luultavasti suuresta IC:n tuotannosta nollakokeissa (kontrolleissa). Toistettavuus oli huonompi käytettäessä 1-oktanolia, mutta se oli silti alle 10 prosenttia 79 prosentissa testiajoista. Suurempi testin sisäinen variaatio saattoi johtua annosteluvirheistä, sillä suljettuihin testipulloihin injektoitiin pieni määrä (3–4 µl) 1-oktanolia. Variaatiokertoimet ovat suuremmat, kun käytetään testikemikaalin pienempiä pitoisuuksia ja varsinkin kun pitoisuus on alle 10 mg C/l. Tämä voidaan estää osittain pienentämällä epäorgaanisen hiilen kokonaismäärää (TIC) inokulaatissa.

▼M4

14. Kun EU:n yhteistutkimuksessa (24) viittä pinta-aktiivista ainetta lisättiin pitoisuudella 10 mg C/l, saatiin seuraavat tulokset.

Testikemikaali	Biohajoavuuden keskiarvo (28 vrk)	Variaatiokerroin (%)	Laboratorioiden määrä
Tetraprolyleeni Bentseenisulfonaatti	17	45	10
Di-iso-oktyylisulfosukkinaatti (anioninen)	72	22	9
Heksadekyyli-trimetyyli (*) Ammoniumkloridi (kationinen)	75	13	10
Iso-nonyylifenoli-$(etoksylaatti)_9$ (ioniton)	41	32	10
Kokamidopropyyli Dimetyylihydroksi Sulfobetaiini (amfoteerinen)	60	23	11

(*) Toksisuutta neutraloitiin lisäämällä SiO_2:ta.

Tulokset osoittavat, että variaatio oli yleensä suurempi, jos pinta-aktiivinen aine oli huonosti hajoava. Testin sisäinen variaatio oli alle 15 prosenttia yli 90 prosentissa tapauksista. Suurin variaatio oli 30–40 prosenttia.

HUOMAUTUS: Useimmat pinta-aktiiviset aineet eivät ole yksimolekyylisiä lajeja, vaan isomeerien, homologien jne. sekoituksia. Ne hajoavat erilaisten latenssiaikojen jälkeen ja erilaisilla kineettisillä nopeuksilla, jolloin käyrät ovat loivia ja epäselviä eikä 60 prosentin kynnysarvoa välttämättä saavuteta 10-päiväisessä jaksossa, vaikka yksin testattuna jokainen yksittäinen molekyylilaji saavuttaisi > 60 prosentin kynnysarvon 10 päivässä. Sama voi ilmetä myös muissa monimutkaisissa seoksissa.

MENETELMÄN KUVAUS

Laite

15. Tavallinen laboratoriolaite ja lisäksi:

a) lasisia seerumipulloja, suljettu butyylikumitulpalla ja alumiinisulkimilla. Suositeltu koko on 125 ml, jolloin kokonaistilavuus on noin 160 ml (tässä tapauksessa jokaisen pullon tilavuuden pitää olla tunnetusti 160 ± 1 ml). Pienempää astiaa voidaan käyttää, kun tulokset täyttävät kohdissa 66 ja 67 kuvatut ehdot

b) hiilianalysaattori tai muu väline (esim. kaasukromatografi) epäorgaanisen hiilen mittaamista varten

▼M4

c) ruiskuja, joiden tarkkuus on suuri, kaasu- ja nestenäytteitä varten

d) orbital-ravistelija ympäristössä, jonka lämpötila on vakioitu

e) hiilidioksiditonta ilmaa – tätä voidaan valmistaa kuljettamalla ilmaa sooda-kalkkirakeiden läpi tai käyttämällä kaasuseosta, jossa on 80 prosenttia N_2:ta ja 20 prosenttia 0_2:ta (valinnainen) (katso kohta 28)

f) kalvosuodatin, huokoskoko 0,20–0,45 μm (valinnainen)

g) orgaanisen hiilen analysaattori (valinnainen).

Reagenssit

16. Käytä pelkästään analyysilaatuisia reagensseja.

Vesi

17. Tislattu tai deionisoitu vesi, jonka orgaaninen kokonaishiilipitoisuus on ≤ 1 mg/l. Tämä edustaa alkuperäistä, testikemikaalin suositellun annoksen antamaa ≤ 5 prosentin orgaanista hiilipitoisuutta.

Mineraalisuolakasvatusalustan kantaliuokset

18. Kantaliuokset ja mineraalisuolakasvatusalusta vastaavat standardia ISO 14593 (16) ja luvun C.4 biohajoavuuden testejä (20). Suuremman ammoniumkloridipitoisuuden (2,0 g/l eikä 0,5 g/l) käyttö on tarpeen vain poikkeustapauksissa, kuten jos testikemikaalin pitoisuus on > 40 mg C/l. Kantaliuokset säilytetään jääkaapissa ja hävitetään kuuden kuukauden kuluttua tai aiemmin, jos on merkkejä saostumisesta tai mikrobikasvustosta. Valmista seuraavat kantaliuokset:

a) kaliumdivetyfosfaatti (KH_2PO_4) 8,50 g

dikaliumvetyfosfaatti (K_2HPO_4) 21,75 g

dinatriumvetyfosfaattidihydraatti ($Na_2HPO_4 2H_2O$) 33,40 g

ammoniumkloridi (NH_4Cl) 0,50 g

Liuota veteen ja täytä 1 litraksi. Liuoksen pH-arvon on oltava 7,4 (± 0,2). Jos näin ei ole, valmista uusi liuos.

b) kalsiumkloridididihydraatti ($CaCl_2 . 2H_2O$) 36,40 g

Liuota veteen ja täytä 1 litraksi.

c) magnesiumsulfaattiheptahydraatti ($MgSO_4 . 7H_2O$) 22,50 g

Liuota veteen ja täytä 1 litraksi.

d) rauta(III)kloridiheksahydraatti ($FeCl_3 . 6H_20$) 0,25 g

Liuota veteen, täytä 1 litraksi ja lisää yksi tippa väkevöityä HCl-liuosta.

Epäorgaanisen liuoksen valmistus

19. Sekoita 10 ml liuosta (a) ja noin 800 ml vettä (kohta 17), lisää sitten 1 ml liuoksia (b), (c) ja (d) ja täytä sitten vedellä 1 litraksi (kohta 17).

Muut reagenssit

20. Väkevöity ortofosforihappo (H_3PO_4) (massa tilavuutta kohti > 85 %).

▼M4

Natriumhydroksidiliuos 7M

21. Liuota 280 g natriumhydroksidia (NaOH) 1 litraan vettä (kohta 17). Määritä tämän liuoksen DIC-pitoisuus ja huomioi arvo testitulosta laskettaessa (katso kohdat 55 ja 61), etenkin kohdassa 66 (b) annetun laatuvaatimuksen kannalta. Valmista uusi liuos, jos DIC-pitoisuus on liian suuri.

Testikemikaali

22. Valmista kantaliuos riittävän vesiliukoisesta testikemikaalista veteen (kohta 17) tai testiviljelyaineeseen (kohta 19). On suositeltavaa, että pitoisuus on satakertainen verrattuna lopulliseen testissä käytettävään pitoisuuteen. Kantaliuoksen pH-arvon säätäminen voi olla tarpeen. Kantaliuos lisätään epäorgaaniseen liuokseen, jotta lopullinen orgaanisen hiilen pitoisuus on 2–40 mg C/l, mieluiten 20 mg C/l. Jos käytetty pitoisuus on tätä alempi, tarkkuus saattaa kärsiä. Liukenevat ja liukenemattomat nestemäiset kemikaalit voi lisätä astioihin suoraan ruiskulla, jonka tarkkuus on suuri. Heikosti liukenevat ja liukenemattomat testikemikaalit saattavat vaatia erityiskäsittelyä (25). Vaihtoehdot ovat seuraavat:

a) tunnettujen punnittujen määrien lisääminen suoraan

b) ultraäänidispersio ennen lisäystä

c) dispersio käyttämällä tarvittavia emulgointiaineita, jotta voidaan määrittää ennen lisäystä, onko niillä inhiboivia tai stimuloivia vaikutuksia mikrobien toimintaan

d) nestemäisten testikemikaalien adsorptio tai liuotus soveltuvaan haihtuvaan liuottimeen, inerttiin aineeseen tai kantaja-aineeseen (esim. lasikuitusuodattimeen), minkä jälkeen mahdollinen liuotin haihdutetaan ja tunnetut määrät lisätään suoraan

e) testikemikaaliliuoksen tunnetun tilavuuden lisääminen helposti haihtuvaan liuottimeen tyhjässä testiastiassa, minkä jälkeen liuotin haihdutetaan.

Aineiden ja liuottimien, joita käytetään kohdissa (c), (d) ja (e), mahdolliset stimuloivat tai inhiboivat vaikutukset mikrobien toimintaan on testattava (katso kohta 42(b)).

Vertailukemikaali

23. Valmista (liukenevan) vertailukemikaalin kantaliuos veteen (kohta 17). On suositeltavaa, että pitoisuus on satakertainen verrattuna lopulliseen testissä käytettävään pitoisuuteen (20 mg C/l).

Inhibition tarkistus

24. Testikemikaalit eivät usein hajoa merkittävästi biohajoavuuden määrittämiseen käytetyissä olosuhteissa. Yksi mahdollinen syy on, että testikemikaali estää inokulaattia pitoisuudella, jossa sitä lisätään testiin. Testiin voidaan sisällyttää inhibition tarkistus, mikä helpottaa inhibition tunnistamista (takautuvasti) mahdolliseksi syyksi tai osatekijäksi. Inhibition tarkistuksella voidaan myös sulkea pois tällaiset vaikutukset ja osoittaa, että nollahajoaminen tai heikko hajoaminen liittyy ainoastaan siihen, että testikemikaalit eivät ole alttiita mikrobihyökkäykselle testiolosuhteissa. Testikemikaalin toksisuudesta (aerobisille) mikro-organismeille saadaan tietoa valmistamalla testiviljelyaine, joka sisältää testikemikaalia ja vertailukemikaalia (kohta 19), kumpaakin lisättävinä pitoisuuksina (katso kohdat 22 ja 23).

▼M4

Siirrosaine

25. Siirrosaine voi olla peräisin monesta eri lähteestä: aktiivilietteestä, jätevedestä (ilman kloorikäsittelyä), pintavedestä, maa-aineksesta tai näiden seoksesta (20). Lähteen biohajoamistoiminta on tarkistettava vertailukemikaalin avulla. Oli lähde mikä tahansa, aiemmin testikemikaalille altistuneita mikro-organismeja ei saa käyttää, jos menetelmää käytetään nopean biohajoavuuden testaamiseen.

Varoitus: aktiiviliete, jätevesi ja poistovesi sisältävät patogeenisiä organismeja, ja niitä on käsiteltävä varoen.

26. Kokemuksen perusteella siirrosaineen optimaalinen tilavuus täyttää seuraavat ehdot:

— mahdollistaa riittävän biohajoamistoiminnan

— hajottaa vertailukemikaalia määrätyssä määrin (katso kohta 66)

— antaa 10^2–10^5 pesäkkeitä muodostavaa yksikköä millilitraa kohden lopullisessa seoksessa

— antaa normaalisti suspendoituneen kiintoaineen pitoisuudeksi 4 mg/l lopullisessa seoksessa, kun käytetään aktiivilietettä. Pitoisuus voi olla enintään 30 mg/l, mutta se voi nostaa CO_2-tuotantoa merkittävästi nollakokeissa (26)

— antaa alle 10 prosenttia testikemikaalin antamasta alkuperäisestä orgaanisen hiilen pitoisuudesta

— 1–10 ml siirrosainetta 1 testiliuoslitraa kohden.

Aktiiviliete

27. Aktiiviliete kerätään tuoreena pääosin kotitalouksien jätevettä käsittelevän vedenpuhdistamon tai laboratoriolaitoksen ilmastussäiliöstä. Tarvittaessa karkeat hiukkaset poistetaan suodattamalla (esim. 1 mm^2:n verkkoseulalla), minkä jälkeen liete pidetään aerobisena.

28. Lietteen annetaan asettua tai se sentrifugoidaan (esimerkiksi 1 100 × g 10 minuutin ajan) karkeiden hiukkasten poiston jälkeen. Pintaliete hylätään. Lietettä voidaan pestä epäorgaanisessa liuoksessa. Väkevöity liete suspendoidaan epäorgaaniseen liuokseen (lopullinen pitoisuus 3–5 g kuiva-ainetta/l) ja säilötään ilmastettuna.

29. Lietteen on tultava tehokkaasti toimivasta, perinteisen tekniikan mukaisesta laitoksesta. Jos liete on otettava suurkuormituslaitoksesta tai jos epäillään lietteen sisältävän inhibiittoreita, liete on pestävä. Liete sekoitetaan hyvin, minkä jälkeen uudelleen suspendoitunut liete saa asettua tai se sentrifugoidaan. Pintaliete hylätään ja pesty liete suspendoidaan uudelleen uuteen epäorgaaniseen liuokseen. Menettelyä toistetaan, kunnes voidaan katsoa, ettei lietteessä ole enää ylimääräistä substraattia tai inhibiittoria.

30. Kun liete on täysin uudelleensuspendoitunut (tai jos lietettä käytetään sellaisenaan), näyte kerätään välittömästi ennen käyttöä. Suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus määritetään näytteestä.

31. Yksi vaihtoehto on lisäksi aktiivilietteen homogenointi (3–5 g suspendoitunutta kuiva-ainetta/l). Lietettä käsitellään Waring-sekoittimessa keskinopeudella 2 minuutin ajan. Sekoitetun lietteen annetaan asettua 30 minuutin ajan (tai tarvittaessa kauemmin), ja neste dekantoidaan. Näin saatua nestettä käytetään siirrosaineena (pitoisuus: 10 ml/l epäorgaanista liuosta).

▼M4

32. CO_2:n muodostumista nollakokeessa voidaan vähentää vielä lisää ilmastamalla lietettä yön yli ilmalla, joka ei sisällä hiilidioksidia. Käytä 4 mg/l aktiivilietteen kiintoainesta siirrosaineen pitoisuutena tässä testissä (13).

Sekundaarinen jätevesi

33. Siirrosaineen lähteenä voidaan käyttää myös pääosin kotitalousjätevesiä puhdistavasta käsittelylaitoksesta tai laboratoriolaitoksesta saatavaa sekundaarista jätevettä. Säilytä näyte aerobisissa olosuhteissa ja käytä se näytteenottopäivänä tai esikäsittele tarvittaessa. Karkeat hiukkaset poistetaan suodattamalla jätevesi karkealla suodattimella ja pH-arvo mitataan.

34. IC-pitoisuutta lasketaan ilmalla, joka ei sisällä hiilidioksidia (kohta 15 e), tunnin ajan samalla, kun pH pidetään arvossa 6,5 ortofosforihapolla (kohta 20). pH-arvo palautetaan alkuperäiseen arvoon natriumhydroksidilla (kohta 21), ja näytteen annetaan asettua noin tunnin, minkä jälkeen siirrosaineeksi otetaan soveltuva tilavuus pintalietettä. Hiilidioksidittoman ilman käyttö laskee siirrosaineen IC-pitoisuutta. Kun suodatetun, ilmakäsitellyn jäteveden suositeltua enimmäistilavuutta (100 ml) litraa kohden käytettiin siirrosaineena, kontrolliastioiden IC-pitoisuus oli 0,4–1,3 mg/l (14), mikä vastaa 2–6,5 prosenttia, kun hiilen pitoisuus testikemikaalissa on 20 mg C/l, ja 4–13 prosenttia, kun hiilen pitoisuus on 10 mg C/l.

Pintavedet

35. Soveltuvasta pintavedestä otetaan näyte. Näytettä säilytetään aerobisissa olosuhteissa, ja se on käytettävä näytteenottopäivänä. Näyte väkevöidään tarvittaessa suodattamalla tai sentrifugoimalla. Jokaisessa testiastiassa käytettävän siirrosaineen tilavuuden on täytettävä kohdassa 26 annetut ehdot.

Maa-ainekset

36. Soveltuvasta maa-aineksesta otetaan näyte enintään 20 cm maan pinnan alta. Kivet, kasvien jäännökset ja selkärangattomat poistetaan maanäytteestä, minkä jälkeen se seulotaan 2 mm:n verkkosiivilällä (jos näyte on niin märkä, ettei sitä voi seuloa heti, anna sen kuivua osittain). Näytettä säilytetään aerobisissa olosuhteissa, ja se on käytettävä näytteenottopäivänä. (Jos näytettä kuljetetaan löysästi suljetussa mustassa polyeteenikassissa, sitä voidaan säilyttää kassissa kuukauden 2–4 °C:n lämpötilassa).

Siirrosaineen esikäsittely

37. Esikäsittelyn avulla siirrosaine voidaan sopeuttaa testiolosuhteisiin, mutta ei testattavaan kemikaaliin. Esikäsittely voi vähentää CO_2:n muodostumista nollakokeessa. Esikäsittelyssä testiaineen pitoisuudeksi laimennetaan 30 mg/l, ja sen jälkeen aktiivilietettä ilmastetaan kostella ilmalla, joka ei sisällä hiilidioksidia, 5–7 päivän ajan testilämpötilassa.

TESTIMENETELMÄ

Pullojen määrä

38. Testiin tarvittava pullojen määrä (kohta 15 a) määräytyy analyysitiheyden ja testin keston mukaan.

39. On suositeltavaa, että kolme pulloa analysoidaan rinnakkain riittävien aikavälien jälkeen, jotta 10-päiväinen jakso voidaan tunnistaa. Vähintään viisi testipulloa (kohta 15 a) sarjoista (a), (b) ja (c) (ks. kohta 42) analysoidaan testin lopussa, jotta biohajoavuuden keskiarvolle voidaan laskea 95 prosentin luottamusvälit.

▼M4

Siirrostettu liuos

40. Siirrosainetta käytetään pitoisuudella 4 mg litrassa aktiivilietteen kiintoainetta. Valmista riittävä määrä siirrostettua liuosta juuri ennen käyttöä lisäämällä esimerkiksi 2 ml sopivasti käsiteltyä aktiivilietettä (kohdat 27–32) pitoisuudella 2 000 mg/l yhteen litraan mineraalisuolakasvatusalustaa (kohta 19). Jos käytetään sekundaarista jätevettä, lisää enintään 100 ml jätevettä (kohta 33) 900 ml:aan mineraalisuolakasvatusalustaa (kohta 19) ja laimenna siirrosaineella 1 litraksi.

Pullojen valmistelu

41. Siirrostetun liuoksen alikvootteja annostellaan rinnakkaispulloihin siten, että kaasutilan (headspace) ja nesteen suhde on 1:2 (jos pullon tilavuus on esim. 160 ml, lisää 107 ml). Muitakin suhteita voi käyttää, mutta katso kohdassa 11 annettu varoitus. Kun käytetään muuntyyppistä siirrosainetta, on varmistettava huolellisesti, että siirrostettu liuos on sekoitettu hyvin, jotta se jakautuu tasaisesti testipulloihin.

42. Pullosarjoihin (kohta 15 a) kuuluvat seuraavat osat:

a) testiastiat (F_T), jotka sisältävät testikemikaalia

b) kontrollipullot (F_B), jotka sisältävät vain testiviljelyainetta ja siirrosainetta. Lisäksi testikemikaalin siirtämiseen testiastioihin voidaan tarvita kemikaaleja, liuottimia, aineita ja lasikuitusuodattimia

c) astiat (F_C), jotka sisältävät vertailukemikaalia testimenettelyn tarkistamista varten

d) tarvittaessa astiat (F_I), joilla tarkistetaan testikemikaalin inhibitiovaikutus ja joissa on sekä testikemikaalia että vertailukemikaalia samoissa pitoisuuksissa (kohta 24) kuin pulloissa F_T ja F_C

e) astiat (F_S), joilla tarkistetaan mahdollinen abioottinen hajoaminen (a) plus 50 mg/l $HgCl_2$:ta tai muulla tavoin steriloituna (esim. autoklaavissa).

43. Vesiliukoiset testikemikaalit ja vertailukemikaalit lisätään vesipitoisina kantaliuoksina (kohdat 22, 23 ja 24), kunnes pitoisuus on 10–20 mg C/l.

44. Liukenemattomat testikemikaalit ja liukenemattomat vertailukemikaalit lisätään pulloihin eri tavoin (katso kohdat 22 a–e) testikemikaalin luonteen mukaan. Ne lisätään joko ennen siirrostettua liuosta tai sen jälkeen testikemikaalin käsittelyn mukaan. Jos käytössä on jokin kohdissa 22 a–e annetuista menetelmistä, kontrollipulloja F_B (kohta 42 b) käsitellään muuten samoin, mutta ilman testikemikaalia tai vertailukemikaalia.

45. Haihtuvat testikemikaalit injektoidaan suljettuihin pulloihin (kohta 47) mikroruiskulla. Annos lasketaan injektoidun tilavuuden ja testikemikaalin tiheyden mukaan.

46. Astioihin lisätään tarvittaessa vettä, jotta nestetilavuus on sama jokaisessa astiassa. On varmistettava, että kaasutilan ja nesteen suhde (yleensä 1:2) ja testikemikaalin pitoisuus ovat sellaisia, että kaasutilassa on riittävästi happea täydellistä biohajoamista varten.

▼M4

47. Sen jälkeen kaikki pullot suljetaan esimerkiksi butyylikumikalvolla tai alumiinikorkilla. Haihtuvat testikemikaalit lisätään tässä vaiheessa (kohta 45). Jos testiliuoksen DOC-pitoisuuden laskua halutaan seurata ja alkuperäisen IC-pitoisuuden nollahetken analyysejä (steriilit kontrollit, kohta 42 e) tai muita analyysejä halutaan tehdä, ota sopivan kokoinen näyte testiastiasta. Hävitä testiastia ja sen sisältö tämän jälkeen.

48. Suljetut pullot asetetaan pyörivään ravistimeen (kohta 15 d), jonka ravistusnopeus riittää pitämään pullojen sisällön hyvin sekoitettuna ja suspendoituneena (esim. 150–200 rpm), ja niitä inkuboidaan pimeässä lämpötilassa 20 °C ± 1 °C.

Näytteenotto

49. Näytteenottotapa määräytyy lag-vaiheen ja testikemikaalin biohajoamisen kineettisen nopeuden mukaan. Pullot analysoidaan näytteenottopäivänä, joita pidetään vähintään kerran viikossa tai useammin (esim. kahdesti viikossa), jos täydellinen hajoamiskäyrä on tarpeen. Tarvittava määrä rinnakkaispulloja (F_T, F_B ja F_C sekä F_I ja F_S, jos käytössä) otetaan ravistajasta (ks. kohta 42). Testin normaali kesto on 28 päivää. Jos biohajoamiskäyrä osoittaa, että tasannevaihe on saavutettu ennen päivää 28, testi voidaan lopettaa jo aikaisemmin. Ota näytteet viidestä pullosta, jotka on varattu testipäivän 28 analysointia varten, ja laske tulosten perusteella luottamusvälit tai biohajoamisprosentin variaatiokerroin. Inhibition ja abioottisen hajoamisen tarkistusta varten varatuista pulloista ei tarvitse ottaa näytteitä yhtä usein kuin muista pulloista. Riittää, kun näyte otetaan päivänä 1 ja 28.

Epäorgaanisen hiilen (IC) analyysi

50. Pullojen CO_2-tuotanto määritetään mittaamalla epäorgaanisen hiilen (IC) pitoisuuden nousu inkubaation aikana. Testin aikana tuotetun IC:n mittaamiseen on kaksi suositeltavaa menetelmää, jotka on kuvattu alla. Koska näiden menetelmien tulokset voivat poiketa hieman toisistaan, käytä vain yhtä menetelmää yhdessä testiajossa.

51. Menetelmä (a) on suositeltava, jos siirrosaineessa on todennäköisesti jäänteitä lasisuodatinpaperista ja/tai liukenemattomasta testikemikaalista. Analyysi voidaan tehdä kaasukromatografilla, jos hiilianalysaattoria ei ole käytettävissä. On tärkeää, että pullot ovat testilämpötilassa tai sitä lähellä, kun kaasutilan kaasua analysoidaan. Menetelmä (b) voi olla helpompi, jos laboratoriossa käytetään hiilianalysaattoreita IC:n mittaamiseen. On tärkeää, että natriumhydroksidiliuos (kohta 21), jolla CO_2 muunnetaan karbonaatiksi, on vasta valmistettu tai sen IC-pitoisuus on tunnettu, jotta se voidaan huomioida testituloksia laskettaessa (ks. kohta 66 b.)

Menetelmä (a): happamoittaminen pH-arvoon < 3

52. Ennen jokaista analyysierää IC-analysaattori kalibroidaan käyttämällä soveltuvaa IC-standardia (esim. 1 % w/w CO_2:ta N_2:ssa). Väkevöity ortofosforihappo (kohta 20) injektoidaan jokaisen pullon kalvon läpi, jotta siirrosaineen pH-arvoksi tulee < 3 (esim. 1 ml, kun testiviljelyaineen tilavuus on 107 ml). Pullot asetetaan takaisin ravistajaan. Kun pulloja on ravistettu yksi tunti testilämpötilassa, ne otetaan pois ravistajasta, kaasualikvootit (esim. 1 ml) otetaan jokaisen pullon kaasutilasta ja injektoidaan IC-analysaattoriin. Mitatut IC-pitoisuudet rekisteröidään (mg C/l).

▼M4

53. Tämä menetelmä perustuu siihen, että kun pH-arvo on happamoitettu alle kolmeen ja tasapainotus tehty lämpötilassa 20 °C, CO_2:n jakautumisen testipullojen neste- ja kaasufaasin välillä tasapainovakio on 1,0 pitoisuutena mitattuna (13). Tämä on osoitettava vähintään kerran seuraavalla tavalla:

Valmistele pullot, joissa IC:tä on 5 ja 10 mg/l, käyttämällä vedetöntä natriumkarbonaattia (Na_2CO_3) ja vettä, joka ei sisällä CO_2:ta ja joka valmistetaan happamoittamalla veden pH-arvoksi 6,5 ortofosrofihapolla (kohta 20). Kuplita yön yli ilmalla, joka ei sisällä CO_2:ta, ja nosta pH neutraaliksi emäksellä. Varmista, että kaasutilan ja nesteen tilavuuksien suhde on sama kuin testeissä (esim. 1:2). Happamoita ja tasapainota kohdan 52 ohjeiden mukaisesti ja mittaa IC-pitoisuudet sekä kaasutilasta että nestefaasista. Tarkista, että nämä kaksi pitoisuutta ovat samat koevirheen sisällä. Jos näin ei ole, työvaiheet on käytävä läpi. IC:n jakautumista neste- ja kaasufaasin välille ei tarvitse tarkistaa aina, kun testi tehdään. Se voidaan tehdä kalibroinnin yhteydessä.

54. Jos DOC-poistumaa halutaan mitata (vain vesiliukoiset testikemikaalit), näytteet otetaan erillisten (happamoittamattomien) pullojen nestefaasista, kalvosuodatetaan ja injektoidaan DOC-analysaattoriin. Näitä pulloja voidaan tarvittaessa käyttää muihin analyyseihin, primaarisen biohajoamisen mittaamista varten.

Menetelmä (b): CO_2:n muuntaminen karbonaatiksi

55. IC-analysaattori kalibroidaan ennen jokaista analyysierää soveltuvalla standardilla, kuten natriumbikarbonaattiluoksella ($NaHCO_3$) vedessä, joka ei sisällä CO_2:ta (ks. kohta 53), IC-pitoisuus 0–20 mg/l. Natriumhydroksidiliuos (7M, kohta 21) (esim. 1 ml, kun testiviljelyaineen tilavuus on 107 ml) injektoidaan kalvon läpi jokaiseen pulloon, josta näyte otetaan, ja pulloja ravistetaan 1 tunti testilämpötilassa. Käytä samaa NaOH-liuosta kaikissa tiettynä päivänä analysoitavissa pulloissa. Samaa liuosta ei kuitenkaan tarvitse käyttää testin kaikilla näytteenottokerroilla. Jos IC:n absoluuttiset nolla-arvot tarvitaan kaikilla näytteenottokerroilla, NaOH-liuoksen IC on määritettävä aina ennen käyttöä. Pullot otetaan pois ravistajasta, ja niiden annetaan tasaantua. Jokaisen pullon nestefaasista otetaan sopiva tilavuus (esim. 50–1 000 µl) ruiskulla. Nämä näytteet injektoidaan IC-analysaattoriin, ja IC-pitoisuudet merkitään ylös. On varmistettava, että käytettävä analysaattori soveltuu tällä menetelmällä tuotettujen emäksisten näytteiden käsittelyyn.

56. Tämä menetelmä perustuu siihen, että kun emästä on lisätty ja pulloja ravistettu, IC-pitoisuus kaasutilassa on hyvin pieni. Tämä on tarkistettava vähintään kerran käyttämällä IC-standardeja, lisäämällä emästä, tasapainottamalla ja mittaamalla IC-pitoisuus sekä kaasutilassa että nestefaasissa (ks. kohta 53). Pitoisuuden pitäisi olla lähes nolla kaasutilassa. Tätä virtuaalisesti täydellisen CO_2-absorption tarkistusta ei tarvitse tehdä aina, kun testi tehdään.

57. Jos DOC-poistumaa halutaan mitata (vain vesiliukoiset testikemikaalit), näytteet otetaan erillisten pullojen (joihin ei ole lisätty emästä) nestefaasista, kalvosuodatetaan ja injektoidaan DOC-analysaattoriin. Näitä pulloja voidaan tarvittaessa käyttää muihin analyyseihin, primaarisen biohajoamisen mittaamista varten.

▼M4

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten laskeminen

58. Jos oletetaan, että testikemikaali on mineralisoitunut sataprosenttisesti CO_2:ksi, kontrollien tuotannon ylittävä ThIC on yhtä kuin jokaiseen testipulloon testin alussa lisätty TOC, eli:

$$ThIC = TOC.$$

Yhdessä pullossa olevan epäorgaanisen hiilen kokonaismassa (TIC) (mg) on:

$$TIC = (\text{mg C nesteessä} + \text{mg C kaasutilassa}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{Yhtälö [1]}$$

jossa:

V_L = nesteen tilavuus pullossa (litraa)

CL = IC-pitoisuus nesteessä (mg/l hiilenä)

VH = kaasutilan tilavuus (litraa)

CH = IC-pitoisuus kaasutilassa (mg/l hiilenä).

TIC-laskelmat tässä testissä IC:n mittaamiseen käytettyä kahta analyysimenetelmää varten on kuvattu kohdissa 60 ja 61. Biohajoamisprosentti (*% D*) saadaan seuraavasti:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Yhtälö [2]}$$

jossa:

TICt = mg TIC testipullossa aikana t

TICb = keskimääräinen mg TIC vertailupulloissa aikana t

TOC = alun perin testiastiaan lisätty mg TOC.

Biohajoamisprosentti % D lasketaan testipulloille (F_T), vertailupulloille (F_C) ja mahdollisille inhibition seurantaan tarkoitetuille pulloille (F_I) kuhunkin näytteenottoaikaan mennessä tuotetun TIC:n määrästä.

59. Jos TIC-pitoisuus on noussut merkittävästi steriileissä kontrolleissa (F_S) testijakson aikana, voidaan päätellä, että testikemikaali on hajonnut abioottisesti. Tämä on huomioitava laskettaessa D:tä kaavalla [2].

Happamoittaminen pH-arvoon < 3

60. Koska happamoittaminen pH-arvoon < 3 ja tasapainottaminen tasapainottaa TIC-pitoisuuden neste- ja kaasufaasissa, ainoastaan kaasufaasin IC-pitoisuus mitataan. Kaava [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, jossa V_B = seerumipullon tilavuus.

CO_2:n muuntaminen karbonaatiksi

61. Tässä menetelmässä laskelmat tehdään kuten kaavassa [1], mutta kaasufaasin hyvin pieni IC-määrä jätetään huomioimatta, eli $V_H \times C_H = 0$, ja $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Tulosten ilmaiseminen

62. Biohajoamiskäyrä saadaan esittämällä biohajoamisprosentti D suhteessa inkubaatioaikaan ja lag-vaihe, biohajoamisvaihe, 10-päiväinen jakso ja tasannevaihe eli vaihe, jolloin maksimaalinen hajoaminen on saavutettu ja biohajoamiskäyrä on loiventunut, ilmaistaan, jos mahdollista. Jos rinnakkaistestipulloista F_T saadaan verrattavissa olevat tulokset (ero < 20 %), piirretään keskiarvokäyrä (ks. lisäys 2, kuva 1). Jos näin ei ole, jokaista astiaa varten piirretään oma käyrä. Tasannevaiheen biohajoamisprosentin keskiarvo määritetään tai korkein arvo arvioidaan (esim. kun käyrä laskee tasannevaiheessa), mutta jälkimmäisessä tapauksessa on tärkeää varmistaa, että arvo ei ole poikkeava havainto. Kirjaa tämä biohajoamisen enimmäistaso testiraporttiin testikemikaalin biohajoamisasteena. Jos testiastioiden määrä ei riittänyt tasannevaiheen osoittamiseen, keskiarvo lasketaan testin viimeisenä päivänä mitatuista tiedoista. Tämä viimeinen arvo, viiden rinnakkaisnäytteen keskiarvo, osoittaa biohajoamisprosentin määritystarkkuuden. Kirjaa ylös myös 10-päiväisen jakson lopussa saatu arvo.

63. Vertailukemikaalin F_C käyrä laaditaan samalla tavalla, ja samoin abioottisen eliminaation tarkistuksen F_S ja inhibition tarkistuksen F_I, jos ne olivat käytössä.

64. TIC:n määrät kontrollipulloissa (F_B) kirjataan samoin kuin pulloissa F_S (abioottinen tarkistus), jos sellaiset olivat käytössä.

65. Laske F_I-astioiden D ainoastaan seoksen vertailukomponentin odotetun teoreettisen IC-saannin perusteella. Jos päivänä 28 $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, voidaan olettaa, että testikemikaali esti siirrosaineen toimintaa, mikä voi selittää testiolosuhteissa saadut matalat D_{FT}-arvot. Tässä tapauksessa testi voidaan toistaa käyttämällä alempaa testipitoisuutta ja mielellään vähentämällä DIC:n määrää siirrosaineessa ja kontrollipulloissa muodostuvaa TIC:tä, sillä muutoin alempi pitoisuus heikentää menetelmän tarkkuutta. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää toista siirrosainetta. Jos TIC-pitoisuus nousee merkittävästi (> 10 %) F_S-pullossa (abioottinen), abioottisia hajoamisprosesseja on voinut tapahtua.

Tulosten luotettavuus

66. Testi on luotettava, jos

a) keskimääräinen hajoamisprosentti astioissa F_C, jotka sisältävät vertailukemikaalia, on > 60 prosenttia 14. inkubaatiopäivään mennessä ja

b) TIC:n keskimääräinen määrä kontrollipulloissa F_B testin lopussa on > 3 mg C/l.

Jos nämä ehdot eivät täyty, testi on toistettava käyttämällä toisesta lähteestä saatua siirrosainetta ja/tai testivaiheet on käytävä läpi. Jos esimerkiksi ongelmana on suuri IC-tuotanto kontrollipulloissa, on noudatettava kohdissa 27–32 annettuja ohjeita.

(1) Hajoamisprosentti astioissa F_C, jotka sisältävät vertailuainetta
(2) Hajoamisprosentti astioissa F_I

▼M4

67. Jos testikemikaali ei saavuteta arvoa 60 % ThIC ja se on osoitettu ei-inhiboivaksi (kohta 65), testi voidaan toistaa käyttämällä suurempaa siirrosaineen pitoisuutta (enintään 30 mg/l aktiivilietettä ja 100 ml jätevettä/l) tai eri lähteestä saatua siirrosainetta, varsinkin jos hajoaminen oli suuruudeltaan 20–60 prosenttia.

Tulosten tulkinta

68. Jos biohajoaminen on > 60 % ThIC 10-päiväisen jakson aikana tässä testissä, testikemikaali on helposti biohajoava aerobisissa oloissa.

69. Jos kynnysarvoa 60 % ThIC ei saavuteta, määritä aineen pH-arvo pulloissa, joita ei ole muutettu happamaksi tai emäksiseksi. Jos arvo on alle 6,5, nitrifikaatiota on voinut tapahtua. Toista tässä tapauksessa testi käyttämällä puskuriliuosta, jonka pitoisuus on suurempi.

Testiraportti

70. Laadi taulukko, johon merkitään jokaisen testipullon (F_T), vertailupullon (F_C) ja mahdollisten inhibition seurantaan tarkoitettujen pullojen (F_I) % D-arvo jokaisena näytteenottopäivänä. Jos rinnakkaispulloista saadaan verrattavissa olevat tulokset, piirrä käyrä arvon % D keskiarvosta ajan suhteen. Kirjaa ylös TIC:n määrä kontrollipulloissa (F_B) ja steriileissä kontrollipulloissa (F_S) DOC ja/tai muut määreet sekä niiden poistumaprosentit.

71. Määritä % D -arvon keskiarvo tasannevaiheessa tai käytä korkeinta arvoa, jos biohajoamiskäyrä laskee tasannevaiheessa, ja anna tämä arvo testikemikaalin biohajoamisasteena. Jälkimmäisessä tapauksessa on tärkeää varmistaa, että korkein arvo ei ole poikkeava arvo.

72. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava ja merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— testikemikaalin puhtaus (epäpuhtaudet),

Testiolosuhteet:

— viittaus tähän testimenetelmään

— käytetyn testijärjestelmän kuvaus (astian tilavuus, kaasutilan ja nesteen suhde, sekoitustapa jne.)

— testikemikaalin ja vertailukemikaalin lisääminen testijärjestelmään: käytetty testipitoisuus ja jokaiseen pulloon annostellun hiilen määrä, mahdollinen liuottimien käyttö

— käytetyn siirrosaineen tiedot, mahdollinen esikäsittely

— inkubointilämpötila

— IC-analyysin periaatteen validointi

— käytetyn IC-analysaattorin (ja muiden käytettyjen analyysimenetelmien) pääominaisuudet

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

Tulokset:

— raakatiedot ja lasketut biohajoavuusarvot taulukkomuodossa

▼M4

— testi- ja vertailukemikaalin hajoamisprosenttikäyrä suhteessa aikaan, lag-vaihe, hajoamisvaihe, 10-päiväinen jakso ja kulmakerroin

— poistumaprosentti tasannevaiheessa, testin lopussa ja 10-päiväisen jakson jälkeen

— syyt mahdolliseen testitulosten hylkäämiseen

— muut käytetyn menetelmän kannalta merkitykselliset tiedot

— tulosten pohdinta.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys – hiilidioksidin muodostumiskoe (Menetelmä C.4-C).

2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159–167.

3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153–1161.

4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195–1210.

5) ISO 9439 (1990; tarkistettu 1999). Water Quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium – Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922–929.

9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801–812.

10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181–185.

11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51–53.

12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233–243.

13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204–211.

14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507–524.

15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527–1550.

▼**M4**

16) ISO 14593, (1999) Water Quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test).

17) Battersby NS (1997). The ISO headspace CO_2 biodegradation test, Chemosphere 34: 1813–1822.

18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An ”inherent” biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219–3235.

20) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys.

21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman’s report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

22) Tämän liitteen luku C.11 Aktiivilietteen soluhengityksen inhibitiotesti.

23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319–327.

24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

25) ISO 10634 (1996) Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼**M4**

Lisäys 1

LYHENTEET JA MÄÄRITELMÄT

IC: ”Inorganic carbon” – Epäorgaaninen hiili

$ThCO_2$: ”Theoretical carbon dioxide” (mg) – Hiilidioksidimäärä, joka lasketaan saatavan testattavan aineen tunnetusta tai mitatusta, epäorgaaniseen muotoon muunnetusta hiilestä. $ThCO_2$ ilmaistaan myös muodostuneen hiilidioksidin painona (mg) testattavan kemikaalin massaa (mg) kohti.

DOC: ”Dissolved organic carbon” – Liuoksessa oleva orgaaninen hiili tai orgaaninen hiili, joka läpäisee 0,45 μm:n suodattimen tai jää pinnalle, kun liuosta on sentrifugoitu nopeudella 40 000 ms^{-2} (n. 4 000 g) 15 minuutin ajan.

DIC: ”Dissolved inorganic carbon” – liuennut epäorgaaninen hiili

ThIC: ”Theoretical inorganic carbon” – teoreettinen epäorgaaninen hiili

TIC: ”Total inorganic carbon” – epäorgaanisen hiilen kokonaismäärä

Helposti biohajoava: Tietyt lopullisen biohajoamisen seulontatestit läpäisseiden kemikaalien yleisluokitus. Kyseiset testit ovat niin tiukkoja, että tällaisten aineiden voidaan katsoa olevan nopeasti ja täydellisesti biohajoavia vedessä ja aerobisissa olosuhteissa.

10-päiväinen jakso: 10 prosentin hajoamistason saavuttamista seuraavat 10 päivää.

Itsestään/luontaisesti biohajoava: Kemikaali, jonka tiedetään varmojen todisteiden perusteella olevan primäärisesti tai lopullisesti biohajoava kaikissa tunnetuissa biohajoavuustesteissä.

Lopullinen aerobinen biohajoaminen: Hajoamisen taso, joka saavutetaan, kun eliöt ovat hyödyntäneet testattavan aineen täysin. Tämän prosessin tuloksena syntyy hiilidioksidia, vettä, epäorgaanisia suoloja ja uutta mikrobista solukkoa (biomassaa).

Mineralisaatio: Orgaanisen yhdisteen täydellinen hajoaminen CO_2:ksi ja H_2O:ksi aerobisissa olosuhteissa sekä CH_4:ksi, CO_2:ksi ja H_2O:ksi anaerobisissa olosuhteissa.

Lag-vaihe: Aika testin alusta siihen, kun hajottavien mikro-organismien sopeutuminen ja/tai adaptaatio on tapahtunut ja testikemikaalin tai orgaanisen aineen biohajoamisaste on havaittavalla tasolla (esim. 10 prosenttia biohajoamisen teoreettisesta enimmäistasosta tai tätä alempi, riippuen mittaustekniikan tarkkuudesta).

Hajoamisvaihe: Hajoamisaika on lag-vaiheen päättymistä seuraava, 90 prosentin hajoamistason saavuttamiseen kuluva ajanjakso.

Tasannevaihe: Tasannevaihe on vaihe, jolloin maksimaalinen hajoaminen on saavutettu ja biohajoamiskäyrä on loiventunut.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

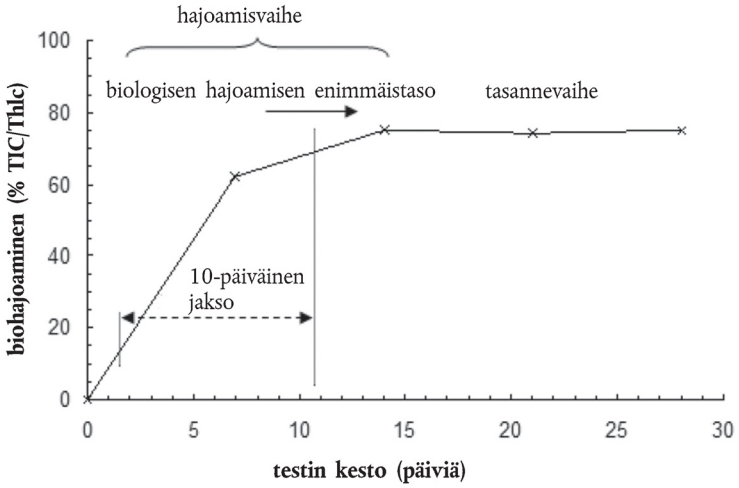
▼**M4**

Lisäys 2

Esimerkki biohajoamiskäyrästä

Kuva 1

1-oktanolin biologinen hajoaminen CO_2-kaasutilatestissä (headspace)



Sanasto

biohajoaminen

hajoamisvaihe

biologisen hajoamisen enimmäistaso

tasannevaihe:

10-päiväinen jakso

testin kesto (päiviä)

▼M4

C.30 BIOKERTYVYYS MAALLA ELÄVISSÄ HARVASUKASMADOISSA

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 317 (2010). Ympäristökohtaloon liittyvistä testimenetelmistä Biokertyvyys: testi kaloilla läpivirtausolosuhteissa (tämän liitteen luku C.13 (49)) julkaistiin vuonna 1996 ja Biokertyvyys pohjaeläiminä lietteessä elävissä harvasukasmadoissa (53) julkaistiin vuonna 2008. Vesiympäristöstä saatujen biokertyvyystietojen ekstrapolointi maalla eläviin organismeihin, kuten lieroihin, on vaikeaa tai mahdotonta. Testikemikaalin rasvahakuisuuteen perustuvia mallilaskelmia, kuten (14) (37), käytetään tätä nykyä, kun arvioidaan kemikaalien biologista kertymistä maahan, kuten esimerkiksi EU:n teknisessä ohjeessa (19). Osa-aluekohtaisen testimenetelmän tarvetta on jo käsitelty, esim. (55). Tällainen menetelmä on erityisen tärkeä, kun arvioidaan sekundaarista myrkytystä maaravintoketjuissa (4). Useissa kansallisissa testimenetelmissä käsitellään biokertymistä muissa organismeissa kuin kaloissa. Esimerkkinä (2) ja (72). ASTM (American Society for Testing and Materials) (3) on kehittänyt menetelmän, jolla voidaan mitata saastuneen maa-aineksen biokertymistä lieroihin (*Eisenia fetida,* Savigny) ja änkyrimatoihin. Kansainvälisesti hyväksytty menetelmä biokertymisen määrittämiseen maaperässä, johon testiainetta on lisätty, edistää kemikaalien riskinarviointia maa-alueen ekosysteemeissä (25) (29).

2. Maata syövät selkärangattomat altistuvat maaperään sitoutuneille kemikaaleille. Näiden eläinten joukossa maalla elävillä harvasukasmadoilla on tärkeä rooli maaperän rakenteessa ja toiminnassa (15) (20). Nämä harvasukasmadot elävät maassa ja osittain maan pinnalla (erityisesti karikkeessa). Ne ovat usein runsaimpia lajeja biomassalla mitattuna (54). Koska nämä eläimet aiheuttavat maaperän bioturbaatiota ja ovat saaliseläimiä, niillä voi olla suuri vaikutus kemikaalien biologiseen hyötyosuuteen muille organismeille, kuten selkärangattomille (kuten petopunkeille ja kovakuoriaisille, esim. (64)) tai selkärankaisille saalistajille (kuten ketuille ja lokeille) (18) (62). Osa maalla elävien harvasukasmatojen lajeista, joita käytetään nykyään ekotoksikologisissa testeissä, on kuvattu liitteessä 5.

3. ASTM:n oppaassa ”Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid Potworm Enchytraeus albidus” (3) on paljon tärkeää ja hyödyllistä tietoa nykyisen maaperän biokertyvyyden testimenetelmän toiminnasta. Muita asiakirjoja, joihin tässä testimenetelmässä viitataan, ovat tämän liitteen luku C.13 Biokertyvyys: testi kaloilla läpivirtausolosuhteissa (49) ja OECD:n testiohje nro 315: Biokertyvyys pohjaeläiminä lietteessä elävissä harvasukasmadoissa (53). Lisäksi testimenetelmän tietolähteinä on käytetty käytännön kokemusta maaperän biokertymistutkimuksista ja julkaistua kirjallisuutta, kuten (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) ja (79).

4. Tämä testimenetelmä soveltuu lähinnä stabiileille, neutraaleille orgaanisille kemikaaleille, jota adsorboituvat maaperään. Maaperään liittyvien stabiileiden metalliorgaanisten yhdisteiden biokertyvyyden testaaminen voi olla mahdollista tällä testimenetelmällä. Menetelmää voidaan soveltaa myös metalleihin ja muihin hivenaineisiin.

ENNAKKOEDELLYTYS

5. Kemikaalin biokertyminen maalla eläviin harvasukasmatoihin on mitattu raskasmetalleilla (ks. esim. (63)) ja pysyvillä orgaanisilla kemikaaleilla, joiden log K_{ow} -arvo on välillä 3,0–6,0, esim. (40). Tällaiset testit koskevat myös seuraavia aineita:

— kemikaalit, joiden log K_{ow} -arvo on yli 6,0 (superhydrofobiset kemikaalit)

▼M4

— kemikaalit, jotka kuuluvat sellaisten orgaanisten kemikaalien luokkaan, jotka voivat tunnetusti biokertyä eläviin organismeihin, kuten pinta-aktiiviset tai hyvin adsorboituvat kemikaalit

— kemikaalit, joiden rakenteelliset ominaisuudet viittaavat mahdolliseen biokertyvyyteen, kuten tunnetusti biokertyvien kemikaalien analogit

— metallit.

6. Testikemikaalin tiedot, kuten yleisnimi, kemiallinen nimi (mieluiten IUPAC-nimi), rakennekaava, CAS-numero, puhtaus, turvallisuus ja varotoimet, asianmukaiset säilytysolosuhteet ja analyysimenetelmät, on selvitettävä ennen tutkimusta. Lisäksi seuraavien seikkojen on oltava tiedossa:

a) vesiliukoisuus

b) oktanoli/vesi-jakautumiskerroin K_{ow}

c) maa-vesijakautumiskerroin K_{oc}

d) höyrynpaine

e) hajoavuus (esim. maassa, vedessä)

f) tunnetut metaboliitit.

7. Radioaktiivisesti merkittyjä ja merkitsemättömiä testikemikaaleja voidaan käyttää. Radioaktiivisesti merkittyjen kemikaalien käyttö on kuitenkin suositeltavaa, sillä se helpottaa analyysiä. Päätös tehdään havaitsemisrajojen tai lähtökemikaalin ja metaboliittien mittaustarpeen perusteella. Jos käytetään radioaktiivisesti merkittyä testikemikaalia ja mitataan radioaktiivisten jäämien kokonaismäärää, on tärkeää, että radioaktiiviset jäämät sekä maaperässä että testiorganismeissa kuvataan lähtötestikemikaalin prosentteina ja merkitään ei-lähtökemikaaleiksi esimerkiksi tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopulla otetuissa näytteissä, jotta lähtötestikemikaalin ja maaperän metaboliittien biokertyvyystekijä (BAF) voidaan laskea (ks. kohta 50). Tässä kuvattua menetelmää on muokattava esimerkiksi käyttämällä riittävää biomassaa, kun mitataan orgaanisia testikemikaaleja tai metalleja, joita ei ole merkitty radioaktiivisesti. Kun mitataan radioaktiivisten jäämien kokonaismäärää (nestetuikelaskennalla uuton jälkeen, polttamalla tai kudosta liuottamalla), biokertyvyystekijä perustuu lähtötestikemikaaliin ja metaboliitteihin. BAF-laskennan on suositeltavaa perustua lähtötestikemikaalin pitoisuuteen organismeissa ja radioaktiivisten jäämien kokonaismäärään. BAF-arvosta lasketaan BSAF-kerroin, joka ilmaisee biokertyvyyttä maaperästä maaeliöstön lajeihin, normalisoituna matojen rasvapitoisuuden ja maaperän orgaanisen hiilen pitoisuuden (OC) suhteen, jotta eri biokertyvyystestien tuloksia voidaan vertailla.

8. Testikemikaalin toksisuuden testissä käytetyille lajeille on oltava tiedossa (esim. vaikutuspitoisuus ECx tai tappava pitoisuus LCx kertymävaiheessa). Ks. esim. (19). Testikemikaalin valitun pitoisuuden on oltava mieluiten noin 1 prosentti sen akuutista asymptoottisesta LC50-arvosta ja vähintään 10 kertaa korkeampi kuin sen havaitsemisraja maassa käytettävällä määritysmenetelmällä. On suositeltavaa käyttää subletaalien tutkittavien ominaisuuksien pitkäaikaisista tutkimuksista saatuja toksisuusarvoja, jos sellaisia on käytettävissä (51) (52). Jos tietoja ei ole saatavissa, välittömän myrkyllisyyden testistä saadaan hyödyllistä tietoa (ks. esim. (23)).

▼M4

9. Testiliuoksissa, maaperässä ja biologisessa aineksessa olevan kemikaalin kvantifioimiseksi täytyy olla käytettävissä sopiva määritysmenetelmä, jonka tarkkuus, täsmällisyys ja herkkyys tunnetaan. Käytettävissä on oltava myös näytteen valmistusta ja säilyttämistä koskevat tiedot sekä materiaalin käyttöturvallisuustiedotteet. Testattavan aineen havaitsemisrajojen sekä maassa että madon kudoksissa pitäisi myös olla tiedossa. Käytettäessä 14C-merkittyä testattavaa ainetta, on tunnettava ominaisradioaktiivisuus (esim. Bq mol-1) ja epäpuhtauksiin liittyvän radioaktiivisuuden prosenttiosuus. Testikemikaalin ominaisradioaktiivisuuden on oltava tarpeeksi korkea, jotta analysointi helpottuu, eivätkä käytetyt testipitoisuudet saa aiheuttaa toksisia vaikutuksia.

10. Testi voidaan tehdä keinomaalla tai luonnonmaalla. Käytetyn luonnonmaan ominaisuudet, kuten maan tai sen ainesosien alkuperä, pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, hiukkaskokojakauma (hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet) ja vedensitomiskyky (WHC), on tiedettävä ennen testin aloittamista (3) (48).

TESTIN PERIAATE

11. Testikemikaalin biokertymistä kuvaavia parametreja ovat biokertyvyystekijä (BAF), kertymävakio (k_s) ja poistumisvakio (k_e). Määritelmät ovat lisäyksessä 1.

12. Testissä on kaksi vaihetta: kertymävaihe (altistusvaihe) ja poistumavaihe (altistuksen jälkeinen vaihe). Kertymävaiheen aikana matojen rinnakkaiset testiryhmät altistetaan maalle, johon on lisätty testikemikaalia. Testieläinten lisäksi on matojen kontrolliryhmä, jotka altistetaan muuten identtisille olosuhteille, mutta ilman testikemikaalia. Testiorganismien kuivapaino ja rasvapitoisuus mitataan. Mittaukset voidaan tehdä kontrolliryhmän madoille. Analyyttiset tausta-arvot saadaan analysoimalla kontrollimatojen ja maan näytteitä. Poistumavaiheessa madot siirretään maahan, joka ei sisällä testikemikaalia. Poistumavaihe tarvitaan muulloin kuin silloin, kun testikemikaalin kertymä on ollut hyvin vähäinen altistusvaiheen aikana. Poistumavaiheesta saadaan tietoa siitä, millä nopeudella testiorganismit erittävät testikemikaalia (esim. (27)). Jos tasapainotilaa ei saavuteta kertymävaiheen aikana, kineettisten parametrien – kineettisen biokertyvyystekijän BAFk, kertymis- ja poistumisvakioiden – määrityksen on hyvä perustua kertymä- ja poistumisvaiheen tulosten samanaikaiseen sovittamiseen. Testikemikaalin pitoisuutta madoissa ja matojen pinnalla seurataan testin kummassakin vaiheessa.

13. Kertymävaiheen aikana mittauksia tehdään näytteenottoajankohtina enintään 14 vuorokauden (änkyrimadot) tai 21 vuorokauden ajan (lierot), kunnes tasapainotila saavutetaan (11) (12) (67). Tasapainotila saavutetaan, kun pitoisuutta madoissa suhteessa aikaan esittävä käyrä on aika-akselin suuntainen ja kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä pitoisuusmääritystä eroavat enintään ± 20 prosenttia tilastollisen vertailun perusteella (esim. varianssianalyysi tai regressioanalyysi).

14. Poistumavaiheessa testiorganismit siirretään astioihin, joissa on samaa substraattia mutta ei testikemikaalia. Poistumavaiheen aikana mittauksia tehdään näytteenottoaikoina 14 vuorokautta (änkyrimadot) tai 21 vuorokautta (lierot), ellei analyyttinen määritys osoita aiemmin, että testikemikaalin jäämät ovat laskeneet madoissa 90 prosenttia. Testikemikaalin pitoisuus madoissa poistumavaiheen jälkeen raportoidaan eliminoitumattomina jääminä. Tasapainotilan biokertyvyystekijä (BAFss) lasketaan mieluiten sekä madoissa

▼M4

(Ca) ja maassa (Cs) olevan pitoisuuden suhteena, kun tasapainotila näyttää olevan saavutettu, että kineettisenä biokertyvyystekijänä (BAFK) maan kertymävakion (ks) ja poistumavakion (ke) 2 suhteena (määritelmät ovat lisäyksessä 1), kun oletetaan, että reaktio noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa (tietoa laskelmista on lisäyksessä 2). Jos on ilmeistä, että reaktio ei noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, on käytettävä muita malleja.

15. Kertymävakio, poistumavakio (tai vakiot, jos käytetään muita malleja), kineettinen biokertyvyystekijä (BAFK) ja mahdollisuuksien mukaan näiden muuttujien luottamusvälit lasketaan tietokonemalleista (ohjeet ovat lisäyksessä 2). Mallin soveltuvuuden voi määrittää esimerkiksi korrelaatiokertoimella tai determinaatiokertoimella (soveltuvuus on hyvä, jos kerroin on lähellä yhtä) tai khii^2-testillä. Myös keskivirheen koko tai arvioitujen parametrien luottamusväli voivat kuvata mallin soveltuvuutta.

16. Jos testikemikaali on hyvin lipofiilinen, testitulosten vaihtelua voi vähentää ilmaisemalla biokertyvyystekijät suhteessa rasvapitoisuuteen ja orgaanisen hiilen pitoisuuteen (kilossa maan orgaanista hiiltä, kilossa madon rasvamäärässä). Tämä perustuu siihen, että tietyissä kemikaalien luokissa biokertyvyyspotentiaalin ja rasvahakuisuuden välillä on selvä suhde, mikä osoitettu kalojen osalta (47). Kalan rasvapitoisuuden ja näiden kemikaalien biokertyvyyden välillä on suhde. Samanlaisia korrelaatioita on havaittu pohjaeliöissä. Tästä esimerkkinä (30) (44). Korrelaatio on osoitettu myös maalla elävien harvasukasmatojen osalta (esim. (5) (6) (7) (14)). Jos matojen kudosta on saatavilla riittävästi, eläinten rasvapitoisuus voidaan määrittää käyttämällä samaa biologista ainesta, jota käytettiin testikemikaalin pitoisuuden määrittämiseen. Rasvapitoisuus voidaan mitata myös kontrollieläimistä.

TESTIN LUOTETTAVUUS

17. Testi on luotettava, jos seuraavat ehdot täyttyvät sekä kontrolli- että käsittelyryhmässä:

— Testin lopussa yleinen kuolleisuus kertymä- ja poistumavaiheen aikana ei saa olla yli 10 prosenttia (lierot) tai 20 prosenttia (änkyrimadot) käytettyjen matojen kokonaismäärästä.

— *Eisenia fetida*- ja *Eisenia andrei* -lajien keskimääräinen painohäviö, joka mitataan kertymävaiheen ja poistumavaiheen lopussa, ei saa olla yli 20 prosenttia verrattuna jokaisen jakson alun alkuperäiseen tuorepainoon (f.w.).

MENETELMÄN KUVAUS

Testilajit

18. Biokertyvyystesteihin suositellaan useita maalla elävien harvasukasmatojen lajeja. Yleisimmin käytetyt lajit tunkioliero eli kompostiliero (*Eisenia fetida*) tai *Eisenia andrei* (Lumbricidae), änkyrimato (*Enchytraeus albidus*), *Enchytraeus crypticus* ja *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae)) on kuvattu lisäyksessä 5.

▼M4

Laite

19. Missään laitteiston osissa ei saisi käyttää materiaaleja, jotka voivat liuottaa tai adsorboida testikemikaalia, joista voi liueta muita kemikaaleja ja jotka voivat vaikuttaa haitallisesti testieläimiin. Testissä voidaan käyttää normaaleja suorakulmaisia tai lieriömäisiä astioita, jotka on valmistettu kemiallisesti inertistä materiaalista ja jotka ovat riittävän tilavia testimatojen määrään nähden. Ruostumatonta terästä, muovia tai lasia voidaan käyttää laitteissa ja välineissä, jotka ovat kosketuksissa testiliuosten kanssa. Testiastiat on peitettävä siten, että madot eivät pääse karkaamaan, mutta astiaan täytyy kuitenkin päästä riittävästi ilmaa. Jos käytettävän kemikaalin adsorptiokerroin on korkea, kuten synteettisillä pyretroideilla, voi olla tarpeen käyttää silanoitua lasia. Tällöin välineet on heitettävä pois käytön jälkeen (49). Radioaktiivisesti merkittyjä testiaineita ja haihtuvia kemikaaleja on estettävä karkaamasta. Testiastioista mahdollisesti haihtuvat jäämät on kerättävä loukuilla (esim. kaasunpesupulloilla), joissa on soveltuvaa adsorbenttia.

Maa-aines

20. Testissä käytettävän maa-aineksen on oltava laadultaan sellaista, että testiorganismit elävät ja mielellään myös lisääntyvät siinä totuttautumisvaiheen ja testin aikana ilman, että niiden ulkonäössä tai käyttäytymisessä havaitaan mitään epänormaalia muutosta. Matojen kuuluu kaivautua maa-ainekseen.

21. Tämän liitteen luvussa C.8 (48) kuvattua keinomaata suositellaan käytettäväksi substraattina testeissä. Ohjeet keinomaan valmistamisesta biokertyvyystestejä varten ja keinomaan säilytysohjeet annetaan lisäyksessä 4. Ilmakuivattua keinomaata voidaan säilyttää huoneenlämpötilassa käyttöön asti.

22. Myös saastumattomalta paikalta kerättyä luonnonmaata voidaan käyttää testeissä ja/tai kasvatuksessa. Luonnonmaasta on annettava vähintään alkuperä (keräyspaikka), pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, hiukkaskokojakauma (hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet), suurin mahdollinen vedensitomiskyky (WHCmax) ja vesipitoisuus prosentteina (3). Hyödyllistä tietoa saadaan, kun maa-aineksesta tai sen ainesosista analysoidaan mikrosaasteet ennen sen käyttöä. Jos käytettävä maa-aines on peräisin viljelysmaasta, sitä ei saa olla käsitelty kasvinsuojeluaineilla tai lannoitettu hoidetuista eläimistä saadulla lannalla vähintään vuoteen eikä orgaanisilla lannoitteilla vähintään kuuteen kuukauteen ennen näytteenottoa (50). Luonnonmaan käsittely ennen laboratoriossa tehtäviä ekotoksikologisia testejä harvasukasmadoilla kuvataan kohdassa (3). Jos käytetään luonnonmaata, säilytysaika laboratoriossa on pidettävä mahdollisimman lyhyenä.

Testikemikaalin lisääminen

23. Testikemikaali lisätään maa-ainekseen. Testikemikaalin fysikaaliskemialliset ominaisuudet on otettava huomioon. Jos testikemikaali on vesiliukoinen, se on liuotettava kokonaan veteen ennen sekoittamista maa-ainekseen. Heikosti veteen liukenevien testikemikaalien suositellussa lisäysmenetelmässä yksi tai monta (keino)maan ainesosaa pinnoitetaan testikemikaalilla. Esimerkiksi kvartsihiekkaa tai sen osaa voidaan liottaa liuoksessa, jossa on testikemikaalia ja soveltuvaa orgaanista liuotinta. Liuoksen annetaan hitaasti haihtua kuivaksi. Sen jälkeen testikemikaalilla pinnoitettu osio sekoitetaan märkään

▼M4

maahan. Tässä menetelmässä on se suuri etu, että maahan ei lisätä lainkaan liuotinta. Kun käytetään luonnonmaata, testikemikaali voidaan lisätä ilmakuivattuun maa-ainekseen, kuten edellä on kuvattu keinomaan osalta, tai sekoittaa märkään maahan, minkä jälkeen mahdollinen liuotusapuaine haihdutetaan. Märän maan ja liuottimien kosketusta on vältettävä, jos suinkin mahdollista. Seuraavat seikat on otettava huomioon (3):

— Jos liuottimena käytetään muuta kuin vettä, liuottimen on oltava veteen sekoittuvaa ja/tai se on voitava poistaa muulla tavoin (kuten haihduttamalla), jotta maa-ainekseen jää vain testikemikaalia.

— Jos liuotinkontrolli on käytössä, negatiivista kontrollia ei tarvita. Liuotinkontrollissa on oltava korkein pitoisuus maahan lisättyä liuotinta. Käytettävän liuottimen on oltava peräisin samasta erästä, josta kantaliuos on tehty. Liuottimen toksisuus ja haihtuvuus sekä testikemikaalin liukenevuus valittuun liuottimeen ovat tärkeimmät kriteerit soveltuvan liuotusapuaineen valinnassa.

24. Jos kemikaali liukenee heikosti veteen ja orgaanisiin liuottimiin, haluttu testipitoisuus saadaan sekoittamalla testikemikaaliin 2,0–2,5 g hienoksi jauhettua kvartsihiekkaa testiastiaa kohden esimerkiksi huhmareella. Tämä kvartsihiekan ja testikemikaalin seos lisätään esikostutettuun maahan ja sekoitetaan hyvin soveltuvaan määrään deionisoitua vettä, jotta saadaan tarvittava kosteuspitoisuus. Lopullinen seos jaetaan testiastioihin. Sama toistetaan jokaista testipitoisuutta varten, ja lisäksi valmistellaan asianmukainen kontrolli, jossa on 2,0–2,5 g hienoksi jauhettua kvartsihiekkaa testiastiaa kohden.

25. Testikemikaalin pitoisuus maassa on määritettävä testikemikaalin lisäämisen jälkeen. Ennen testiorganismien lisäämistä on varmistettava, että testikemikaali on jakautunut homogeenisesti maahan. Käytetty lisäysmenetelmä ja tietyn lisäysmenetelmän valintaperusteet ilmoitetaan (24).

26. Ihanteellisessa tilanteessa maa ja huokosvesifaasi ovat tasapainossa ennen organismien lisäämistä. Suositeltava tasapainotusjakso on neljä päivää lämpötilassa 20 °C. Useilla heikosti veteen liukenevilla orgaanisilla kemikaaleilla vie päiviä tai kuukausia, ennen kuin adsorboituneet ja liuotetut fraktiot ovat aidosti tasapainossa. Tutkimuksen tarkoituksen vaatiessa, esimerkiksi ympäristöolosuhteita jäljiteltäessä, maata, johon testikemikaalia on lisätty, voidaan ”kypsyttää” pidempäänkin, esimerkiksi kolme viikkoa lämpötilassa 20 °C, kun kyseessä ovat metallit (22).

Testiorganismien viljely

27. Madot pidetään mieluiten pysyvästi laboratorioviljelmässä. *Eisenia fetidan*, *Eisenia andrein* ja *Enchytraeid*-lajien laboratorioviljelyohjeet ovat lisäyksessä 5 (ks. myös (48) (51) (52)).

28. Testeissä käytettävillä madoilla ei saa olla havaittavia sairauksia, poikkeavuuksia tai loisia.

TESTIN SUORITTAMINEN

29. Testiorganismit altistetaan testikemikaalille kertymävaiheessa. Kertymävaiheen pituus on 14 vuorokautta (änkyrimadot) tai 21 vuorokautta (lierot), ellei jo aiemmin voida osoittaa, että tasapainotila on saavutettu.

▼M4

30. Poistumavaiheessa madot siirretään maahan, joka ei sisällä testikemikaalia. Ensimmäinen näyte otetaan 4–24 h poistumavaiheen alkamisen jälkeen. Esimerkkejä 21-päiväisen kertymävaiheen ja 21-päiväisen poistumavaiheen näytteenoton aikatauluista on lisäyksessä 3.

Testiorganismit

31. Monien maalla elävien änkyrimatolajien yksilöpaino on hyvin pieni (esim. *Enchytraeus albidus* -yksilöiden märkäpaino 5–10 mg ja *Enchytraeus crypticus*- ja *Enchytraeus luxuriosus* -lajien vähemmän). Jotta paino voidaan mitata ja kemiallinen analyysi tehdä, voi olla tarpeen yhdistää rinnakkaisten testiastioiden madot (eli kaikkia rinnakkaisastian matoja käytetään yhteen kudosanalyysiin). Jokaiseen rinnakkaisastiaan lisätään 20 änkyrimatoa, ja rinnakkaisnäytteitä on oltava vähintään kolme. Jos testikemikaalin analyyttinen havaitsemisraja on korkea, matoja saatetaan tarvita enemmän. Jos testilajin yksilöpaino on tätä suurempi (*Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei*), voidaan käyttää rinnakkaisnäyteastioita, joissa on vain yksi yksilö.

32. Testissä käytettävien lierojen on painettava suunnilleen yhtä paljon (esim. *Eisenia fetidan* ja *Eisenia andrein* yksilöpainon on oltava 250–600 mg). Änkyrimatojen (esim. *Enchytraeus albidus*) pituuden on oltava noin 1 cm. Kaikkien tietyssä testissä käytettävien matojen on oltava peräisin samasta lähteessä, ja eläinten on oltava aikuisia ja sukukypsiä (ks. lisäys 5). Koska eläimen paino ja ikä saattavat vaikuttaa BAF-arvoihin (esim. rasvapitoisuuden vaihtelun ja/tai munien vuoksi), nämä parametrit on kirjattava täsmällisesti ja huomioitava tuloksia tulkittaessa. Lisäksi BAF-arvoihin vaikuttaa myös munakoteloiden mahdollinen muniminen altistusjaksolla. On suositeltavaa, että testimatojen alaryhmä punnitaan ennen testiä, jotta keskimääräinen märkä- ja kuivapaino voidaan arvioida.

33. Maa-mato-suhteen on oltava korkea, jotta testikemikaalin pitoisuuden lasku maassa voidaan minimoida kertymisjakson aikana. *Eisenia fetida*- ja *Eisenia andrei* -lajeille maata on oltava vähintään 50 g (kuivapaino) matoa kohden, ja änkyrimadoille suositellaan vähintään 10–20 g maata (kuivapaino) testiastiaa kohden. Astiassa olevan maakerroksen paksuuden on oltava 2–3 cm (änkyrimadot) tai 4–5 cm (lierot).

34. Testissä käytetyt madot poistetaan viljelmästä (esim. änkyrimadot korupihdeillä). Aikuiset eläimet siirretään käsittelemättömään testimaahan totuttautumista varten ja ruokitaan (ks. kohta 36). Jos testiolosuhteet poikkeavat viljelyolosuhteista, 24–72 tunnin totuttamisjakso on riittävä, jotta madot ehtivät sopeutua testioloihin. Totuttamisjakson jälkeen lierot huuhdellaan siirtämällä ne lasimaljoihin (esim. petrimaljoihin), joissa on puhdasta vettä. Lierot punnitaan, ennen kuin ne lisätään testimaahan. Ennen punnitusta ylimääräinen vesi poistetaan madoista painamalla niitä varovasti astian reunaa vasten tai taputtelemalla ne varovasti kuiviksi kevyesti kostutetulla paperiliinalla.

35. Testiorganismien kaivautumiskäyttäytymistä havainnoidaan ja tiedot kirjataan ylös. Kun testeissä käytetään lieroja, eläimet (kontrolli- ja testieläimet) yleensä kaivautuvat maahan parissa tunnissa. Tarkista asia 24 tunnin kuluessa siitä, kun madot on lisätty testiastioihin. Jos lierot eivät kaivaudu maahan (esim. yli 10 prosenttia on kaivautumatta yli puolet aikaa kertymävaiheesta), testiolosuhteet eivät ole sopivat tai testiorganismit eivät ole

▼M4

terveitä. Tällöin testi on lopetettava ja aloitettava alusta. Änkyrimadot elävät lähinnä maan huokosissa, ja niiden ruumiinpeite on usein vain osittaisessa kosketuksessa ympäröivään substraattiin. Kaivautuvien ja ei-kaivautuvien änkyrimatojen altistuksen oletetaan olevan vastaava, eikä testiä tarvitse välttämättä toistaa, jos änkyrimadot eivät kaivaudu.

Ruokinta

36. Ruokintaa on harkittava, jos käytetään maata, jossa orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus on matala. Kun käytetään keinomaata, lieroille on suositeltavaa antaa kerran viikossa 7 mg kuivatettua lantaa yhtä grammaa maata (kuivapaino) kohden ja änkyrimadoille 2–2,5 mg jauhettuja kaurahiutaleita viikossa yhtä grammaa maata (kuivapaino) kohden (11). Ensimmäinen ravintoannos sekoitetaan maahan heti testiorganismien lisäämisen jälkeen. Viljelmissä on suositeltavaa käyttää samantyyppistä ravintoa (katso lisäys 5).

Valo ja lämpötila

37. Testeissä testiastioiden ympäristössä käytetään kontrolloitua valon ja pimeän vaihtelua siten, että 16 tuntia on valoisaa ja 8 tuntia pimeää. Valon suositeltava voimakkuus on 400–800 luksia (3). Lämpötilan on oltava 20 ± 2 °C koko testin ajan.

Testipitoisuudet

38. Testissä käytetään yhtä pitoisuutta. Lisäpitoisuutta tai -pitoisuuksia saa käyttää vain perustellusta syystä. Jos testikemikaalin toksisuus (ECx) on lähellä analyyttistä havaitsemisrajaa, on suositeltavaa käyttää radioaktiivisesti merkittyä testikemikaalia, jonka ominaisradioaktiivisuus on korkea. Metallien osalta pitoisuuden on oltava taustatasoa korkeampi kudoksissa ja maassa.

Rinnakkaisnäytteet

39. Kineettisissä mittauksissa (kertymä- ja poistumavaihe), käsiteltyjen rinnakkaisastioiden määrä on vähintään kolme näytteenottokertaa kohden. Rinnakkaisnäytteitä on valmistettava niin monta, että ne riittävät kaikkiin näytteenottokertoihin kertymä- ja poistumavaiheen aikana.

40. Biologisiin havaintoihin ja mittauksiin (esim. kuivapainon ja märkäpainon suhde, rasvapitoisuus) ja matojen ja maan taustapitoisuuksien analysointiin tarvitaan vähintään 12 rinnakkaisastiaa negatiivista kontrollia varten (neljä alussa, neljä kertymävaiheen lopussa ja neljä poistumavaiheen lopussa), jos ei käytetä muuta liuotinta kuin vettä. Jos testikemikaalin lisäämisessä käytetään jotakin liuotusapuainetta, käsiteltyjen rinnakkaisnäytteiden lisäksi tarvitaan liuotinkontrolli (neljä rinnakkaisastiaa alussa, neljä kertymävaiheen lopussa ja neljä poistumavaiheen lopussa), jossa on kaikki muut ainesosat testattavaa ainetta lukuun ottamatta. Tässä tapauksessa voidaan valmistella vielä neljä negatiivista kontrolliastiaa (ei liuotinta) valinnaista näytteenottoa varten kertymävaiheen lopussa. Rinnakkaisnäytteitä verrataan biologisesti liuotinkontrolliin, jotta saadaan tietoa liuottimen mahdollisesta vaikutuksesta testiorganismeihin. On suositeltavaa perustaa varalle riittävä määrä ylimääräisiä rinnakkaisastioita (esim. kahdeksan) käsittelyä ja kontrollia/kontrolleja varten.

▼M4

Maan laatua koskevien mittausten taajuus

41. Maan pH, maan kosteuspitoisuus ja lämpötila (jatkuva) testihuoneessa mitataan kertymä- ja poistumavaiheen alussa ja lopussa. Maan kosteuspitoisuus tarkistetaan kerran viikossa punnitsemalla testiastiat ja vertaamalla todellista painoa alkuperäiseen painoon testin alussa. Vedenhukka korvataan lisäämällä deionisoitua vettä.

Näytteenotto ja analyysit madoista ja maasta

42. Esimerkki lierojen ja änkyrimatojen biokertymistestien kertymä- ja poistumavaiheen aikataulusta on lisäyksessä 3.

43. Testiastioista otetaan maanäyte, josta määritetään testikemikaalin pitoisuus ennen matojen lisäämistä sekä kertymä- ja poistumavaiheen aikana. Testin aikana testikemikaalin pitoisuudet määritetään madoista ja maasta. Kokonaispitoisuudet maassa mitataan. Pitoisuudet huokosvedessä voidaan myös mitata haluttaessa. Tässä tapauksessa perusteet ja soveltuvat menetelmät on määritettävä ennen tutkimuksen aloittamista ja sisällytettävä raporttiin.

44. Madoista ja maasta otetaan näyte vähintään kuusi kertaa kertymä- ja poistumavaiheen aikana. Jos testikemikaalin stabiilisuus on osoitettu, maa-analyysien määrää voi vähentää. On suositeltavaa analysoida vähintään kolme rinnakkaisnäytettä kertymävaiheen alussa ja lopussa. Jos kertymävaiheen lopussa mitattu pitoisuus maassa poikkeaa alkuperäisestä pitoisuudesta yli 30 prosenttia, myös muina päivinä otetut maanäytteet on analysoitava.

45. Poista kunakin näytteenottoajankohtana madot tietyn rinnakkaisnäytteen maasta (esim. levittämällä rinnakkaisnäytteen maa-aines matalalle vadille ja poimimalla madot pehmeillä korupihdeillä) ja huuhtaise madot vedellä matalassa lasi- tai teräsastiassa. Poista ylimääräinen vesi (ks. kohta 34). Siirrä madot varovasti esipunnittuun astiaan ja punnitse ne heti suolen sisältö mukaan lukien.

46. Sen jälkeen lierojen (*Eisenia*) annetaan tyhjentää suoli yli esim. kostealle suodatinpaperille peitetyssä petrimaljassa (ks. kohta 34). Kun suoli on tyhjennetty, matojen paino määritetään, jotta mahdollinen biomassan lasku testin aikana voidaan määrittää (katso kohdassa 17 annetut luotettavuuskriteerit). Änkyrimadot punnitaan ja kudokset analysoidaan ilman suolen tyhjentämistä, sillä se on teknisesti vaikeaa matojen pienen koon vuoksi. Kun lopullinen painon määritys on tehty, madot tapetaan heti soveliaimmalla tavalla (esim. nestemäisellä typellä tai pakastamalla alle –18 °C:n lämpötilassa).

47. Poistumavaiheen aikana madot korvaavat kontaminoituneen suolensisällön puhtaalla maalla. Siitä syystä matojen, jotka eivät tyhjennä suolta (tässä yhteydessä änkyrimatojen), heti poistumavaiheen jälkeen tehdyissä mittauksissa on mukana suolen kontaminoitunut maa. Vedessä elävien harvasukasmatojen osalta oletetaan, että poistumavaiheen ensimmäisten 4–24 tunnin jälkeen kontaminoitunut suolen sisältö on korvautunut puhtaalla sedimentillä, esim. (46). Vastaavia löydöksiä on raportoitu lieroista radioaktiivisesti merkityn kadmiumin ja sinkin kertymisen tutkimuksissa (78). Änkyrimadoilla, joiden suolta ei ole tyhjennetty, tätä poistumavaiheen ensimmäistä näytettä voidaan pitää kudospitoisuutena suolen tyhjennyksen jälkeen. Jotta kontaminoitumattoman maan laimentava vaikutus testattavan aineen pitoisuuteen poistumavaiheessa voidaan huomioida, suolen sisällön paino voidaan arvioida madon märkäpainon ja tuhkapainon tai madon kuivapainon ja tuhkapainon suhteesta.

▼M4

48. Maa- ja matonäytteet on suositeltavaa analysoida heti poistamisen jälkeen (1–2 päivän kuluessa), jotta hajoaminen ja muu hävikki voidaan välttää, ja keskimääräiset kertymä- ja poistumanopeudet on suositeltavaa laskea testin kuluessa. Jos analyysi viivästyy, näytteitä säilytetään asianmukaisella tavalla, kuten pakastamalla (≤ –18 °C).

49. On tarkistettava, että kyseisessä menetelmässä kemiallisen analyysin tarkkuus ja toistettavuus sekä testikemikaalin saalis maa- ja matonäytteistä ovat tyydyttävät. Havaitsemisraja (LOD) ja määritysraja (LOQ) on raportoitava. On myös tarkistettava, että testikemikaalia ei havaita kontrolliastioissa taustapitoisuutta suurempina pitoisuuksina. Kun testikemikaalin pitoisuus testiorganismissa Ca on > 0 kontrollimadoissa, se on sisällytettävä kineettisten parametrien laskentaan (ks. lisäys 2). Kaikkia näytteitä on käsiteltävä koko testin ajan siten, että esim. kontaminaatio ja hävikki (joka johtuu esim. testikemikaalin adsorboitumisesta näytteenottovälineeseen) on mahdollisimman vähäistä).

50. Kun testikemikaalit ovat radioaktiivisesti merkittyjä, voidaan analysoida lähtökemikaali ja metaboliitit. Lähtötestikemikaalin ja metaboliittien kvantifiointi tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopussa antaa tärkeää tietoa. Sen jälkeen näytteet ”puhdistetaan” siten, että lähtötestikemikaali voidaan määrittää erikseen. Jos yksittäiset metaboliitit muodostavat yli 10 prosenttia analysoidun näytteen tai näytteiden radioaktiivisuudesta, näiden metaboliittien tunnistus on suositeltavaa.

51. Kokonaissaanto sekä testikemikaalin saanto madoista, maasta ja mahdollisista loukuista, joissa on adsorbentteja haihtuneen testikemikaalin keräystä varten, on kirjattava ylös ja raportoitava.

52. Tietystä testiastiasta otetut yksilöt voidaan yhdistää, jos kyseessä ovat änkyrimadot, jotka ovat pienempiä kuin lierot. Jos yhdistäminen vähentää rinnakkaisnäytteiden määrää, soveltuvien tilastomenetelmien määrä laskee. Jos tietty tilastomenetelmä ja tilastollinen voima ovat tarpeen, testissä on oltava yhdistämisen, tarvittavien menetelmien ja tilastollisen voiman edellyttämä määrä rinnakkaisastioita.

53. BAF on suositeltavaa ilmaista kokonaiskuivapainon funktiona ja tarvittaessa (esim. hyvin hydrofobiset kemikaalit) rasvapitoisuuden funktiona. Rasvapitoisuus on määritettävä soveltuvilla menetelmillä (tähän tarkoitukseen mukautetaan olemassa olevia menetelmiä, esim. (31) (58)). Näissä menetelmissä käytetään kloroformi-metanoliuuttoa. Kloorattujen liuottimien käyttöä on kuitenkin hyvä välttää. Käytä kohdassa (17) kuvattua Blighin ja Dyerin menetelmän muunnosta (9). Koska eri menetelmillä ei välttämättä saada samoja arvoja, on tärkeää kuvailla käytetty menetelmä. Ihanteellisessa tapauksessa (jos esim. matokudosta on riittävästi) rasva-analyysi tehdään samalle näytteelle tai uutteelle, josta testattava aine määritetään, koska rasvat täytyy usein poistaa uutteesta ennen kuin sitä voi käyttää kromatografiseen määritykseen (49). Rasvapitoisuus voidaan mitata myös kontrollieläimistä BAF-arvojen normalisointia varten. Jälkimmäinen vaihtoehto vähentää välineiden kontaminaatiota testikemikaalilla.

▼M4

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

54. Testikemikaalin kertymäkäyrä saadaan esittämällä madoissa tai matojen pinnalla kertymävaiheen aikana oleva testikemikaalin pitoisuus ajan funktiona aritmeettisella asteikolla. Jos käyrä osoittaa tasannevaihetta tai tasapainotilaa (määritelmät ovat lisäyksessä 1), tasapainotilan biokertymiskerroin BAF lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$\frac{C_a \text{ tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopussa (keskiarvo)}}{C_s \text{ tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopussa(keskiarvo)}}$$

C_a on testikemikaalin pitoisuus testiorganismissa

C_s on testikemikaalin pitoisuus maassa

55. Jos tasapainotilaa ei saavuteta, BAFss-arvon sijaan määritetään nopeusvakioihin perustuva BAF_K seuraavasti:

— Määritä kertyvyyskerroin (BAF_K) kertymävakion (k_s) ja poistumavakion (k_e) suhteena.

— Kertymä- ja poistumanopeudet on hyvä laskea samaan aikaan (ks. kaava 11 lisäyksessä 2).

— Poistumavakio (k_e) määritetään yleensä poistumakäyrästä, joka kuvaa testiaineen pitoisuutta madoissa poistumavaiheessa. Kertymävakio (k_s) lasketaan tunnetulla k_e-arvolla ja C_a-arvolla, joka saadaan kertymäkäyrästä (ks. lisäys 2). Paras menetelmä BAF_K:n ja nopeusvakioiden k_s ja k_e laskemiseksi on estimoida tietokoneella epälineaariset parametrit. Jos on ilmeistä, ettei poistuma noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, on käytettävä monimutkaisempia malleja.

Testiraportti

56. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— käytettävissä olevat tiedot testikemikaalin välittömästä tai pitkäaikaistoksisuudesta (esim. EC_x, $LC_{x,,}$ NOEC) maalla eläville harvasukasmadoille

— puhtaus, fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, esim. log K_{ow}, vesiliukoisuus

— kemialliset tunnistetiedot, testattavan aineen lähde, mahdollisen liuottimen tunnistetiedot ja pitoisuus

— jos testikemikaali on radioaktiivisesti leimattu, leimattujen atomien tarkka sijainti, ominaisradioaktiivisuus ja radiokemiallinen puhtaus.

Testilajit:

— tieteellinen nimi, kanta, lähde, mahdollinen esikäsittely, totuttamistiedot, ikä, koko jne.

▼M4

Testiolosuhteet:

— käytetty testimenetelmä

— käytetty valaistustyyppi ja valon ominaisuudet sekä valojakso(t)

— testisuunnitelman kuvaus (esim. testiastioiden määrä ja koko, maan massa ja maakerroksen korkeus, rinnakkaisnäytteiden määrä, matojen määrä rinnakkaisnäytettä kohden, testipitoisuuksien määrä, kertymä- ja poistumavaiheen kesto, näytteenottotaajuus)

— testiastian materiaalin valintaperusteet

— testattavan aineen valmistelu ja lisäys sekä tietyn menetelmän valintaperusteet

— nimelliset testipitoisuudet, testiastioissa mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat sekä menetelmä, jolla arvot on laskettu

— keinomaan ainesosien lähde tai maa-aineksen alkuperä, jos käytetään luonnollista maata, mahdollisen esikäsittelyn kuvaus, kontrollien tulokset (eloonjäänti, biomassan kehitys, lisääntyminen), maan ominaisuudet (pH, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus, hiukkaskokojakauma eli hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet, WHC_{max}, vesipitoisuus prosentteina testin alussa ja lopussa sekä muut tehdyt mittaukset)

— yksityiskohtaiset tiedot maa- ja matonäytteiden käsittelystä, mukaan lukien tiedot testattavan aineen säilytyksestä, lisäämistavasta, uutosta ja analyysimenetelmistä (sekä tarkkuudesta) matojen ja maan osalta sekä rasvapitoisuudesta (jos mitattu) ja testiaineen saannista.

Tulokset:

— kontrollimatojen ja jokaisessa testiastiassa olevien matojen kuolleisuus sekä mahdolliset havainnot epätavallisesta käyttäytymisestä (esim. maan välttely, lisääntymisen puute änkyrimatojen biokertyvyystestissä)

— maan ja testiorganismien kuiva- ja märkäpainon suhde (hyödyllinen normalisointia varten)

— matojen märkäpainot jokaisella näytteenottokerralla, lierojen märkäpainot testin alussa sekä jokaisella näytteenottokerralla ennen suolen tyhjennystä ja sen jälkeen

— testiorganismien rasvapitoisuus (jos määritetty)

— käyrät, jotka osoittavat testikemikaalin kertymä- ja poistumakinetiikan madoissa, ja aika tasapainotilan saavuttamiseen

— C_a ja C_s (tarvittaessa keskihajonta ja alue) kaikille näytteenottoajankohdille (C_a ilmaistaan muodossa grammaa kilossa koko ruumiin märkä- ja kuivapainoa ja C_s muodossa grammaa kilossa maan märkä- ja kuivapainoa) jos eliöstön-maaperän kertyvyyskerroin (BSAF) tarvitaan (esim. kahden tai usean testin tulosten vertailuun, kun eläinten rasvapitoisuus poikkeaa toisistaan), C_a voidaan ilmaista myös muodossa grammaa kilossa organismin rasvamäärässä ja C_s muodossa grammaa kilossa maan orgaanista hiiltä (OC)

— BAF (kiloa maata kilossa matoa), maan kertymävakio k_s (grammaa maata kilossa matoa, päivä$^{-1}$), poistumavakio k_e (päivää$^{-1}$) ja BSAF (kiloa maan orgaanista hiiltä kilossa madon rasvamäärässä) voidaan myös ilmoittaa

▼M4

— jos mitattu: maassa ja testieläimissä havaitut lähtökemikaalin, metaboliittien ja sitoutuneiden jäämien prosenttiosuudet (esim. testikemikaalin, jota ei voida uuttaa tavallisilla uuttomenetelmillä, määrä prosentteina)

— tietojen tilastollisessa analysoinnissa käytetyt menetelmät.

Tulosten arviointi

— kohdassa 17 annettujen luotettavuusehtojen täyttyminen

— odottamattomat tai epätavalliset tulokset, kuten testikemikaalin epätäydellinen poistuminen testieläimistä.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688–00a.

3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: s. 26

4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.

5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93–99.

6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W&Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154–165.

7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185–191.

8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1–13.

9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911–917.

10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, s. 671.

11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185–196.

13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13–20.

▼M4

14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91–100.

15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2–29.

16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, s. 555–576.

17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140–145.

19) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006, annettu 18 päivänä joulukuuta 2006, kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta, EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.

20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman&Hall, London, s. 426.

21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: s. 149 Ladattavissa osoitteessa: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf

23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: s. 57

24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195–208.

26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897–1905.

27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501–1514.

28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, s. 156.

▼M4

29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF – Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78–84.

30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225–1231.

31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099–1105.

32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15–20.

34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. Teoksessa: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W.&Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.

35) ISO 11268–2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

36) Jaenike J (1982). "E*isenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4: 6–8.

37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080–2090.

38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953–961.

39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767–775.

40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399–3404.

41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.

42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217–232.

43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, s. 137.

44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588–595.

45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17–26.

46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244–1249.

▼M4

47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

48) Tämän liitteen luku C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla.

49) Tämän liitteen luku C.13. Biokertyvyys: testi kaloilla läpivirtausolosuhteissa.

50) Tämän liitteen luku C.21. Maaperän mikrobit: typen muuntumistesti.

51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287–388.

55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. Teoksessa: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378–396.

56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77–81.

57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431–1436.

59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: s. 373

61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W.&Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105–129.

62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107–127.

63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110–2120.

64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413–433.

65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M.&Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309–320.

69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67–81.

70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167–1171.

71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277–285.

74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW&Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023–1033.

76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409–417.

77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161–165.

78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843–1851.

79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Biokertyvyys on organismissa tai sen pinnalla olevan testikemikaalin pitoisuuden lisääntyminen verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen väliaineessa. Biokertymistä aiheuttaa biokonsentraatio ja biomagnifikaatio (katso seuraavat kohdat).

Biokonsentraatio on organismissa tai sen pinnalla olevan testikemikaalin pitoisuuden lisääntyminen, joka johtuu ainoastaan kemikaalin kertymisestä ympäröivästä väliaineesta (ruumiin pinnan ja syödyn maan kautta), verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen väliaineessa.

Biomagnifikaatio on organismissa tai sen pinnalla olevan testikemikaalin pitoisuuden lisääntyminen, joka johtuu pääasiassa kontaminoituneen ravinnon tai saaliin nauttimisesta, verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen ravinnossa tai saaliissa. Biomagnifikaatio voi aiheuttaa testattavan aineen siirtymistä tai kertymistä ravintoverkoissa.

Poistuminen on testikemikaalin poistumista testiorganismikudoksesta aktiivisilla tai passiivisilla prosesseilla riippumatta siitä, onko ympäröivässä väliaineessa testattavaa ainetta vai ei.

Biokertyvyystekijä (BAF) minä tahansa tämän kertyvyystestin kertymävaiheen ajankohtana on testikemikaalin pitoisuus testiorganismissa tai sen pinnalla (C_a, grammaa kilossa madon kuivapainoa) jaettuna kyseisen kemikaalin pitoisuudella väliaineessa (C_s, grammaa kilossa maan kuivapainoa). BAF ilmoitetaan kiloina maata kilossa matoa.

Biokertyvyystekijä tasapainotilassa (BAF_{ss}) ei muutu merkittävästi pitkän ajanjakson aikana, kun testikemikaalin pitoisuus väliaineessa on vakio tänä aikana (C_s, grammaa kilossa maan kuivapainoa).

Biokertyvyystekijöitä, jotka on laskettu suoraan maan kertymävakion (k_s) ja poistumavakion (k_e) suhteesta (katso jäljempänä), sanotaan kineettisiksi biokertyvyystekijöiksi (BAF_K).

Eliöstön-maaperän kertyvyyskerroin (BSAF) on testikemikaalin rasvan suhteen normalisoitu pitoisuus testiorganismissa tai sen pinnalla jaettuna orgaanisen hiilen suhteen normalisoidulla pitoisuudella maassa tasapainotilassa. C_a ilmaistaan grammoina kilossa organismin rasvamäärässä, ja C_s grammoina kilossa maan orgaanista ainesta. BSAF ilmaistaan kiloina orgaanista hiiltä kilossa rasvaa.

Tasannevaihe tai **tasapainotila** on altistusvaiheessa samanaikaisesti tapahtuvien kertymä- ja poistumaprosessien välinen tasapainotila. Tasapainotila saavutetaan BAF:ää ajan funktiona esittävässä käyrässä silloin, kun käyrä on aika-akselin suuntainen, kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä BAF-määritystä poikkeavat enintään ± 20 prosenttia eikä näiden kolmen näytteenottoajanjakson välillä ole tilastollisesti merkitseviä eroja. Kun testataan kemikaaleja, jotka kertyvät hitaasti, välit voivat olla pikemminkin seitsemän vuorokautta (49).

Orgaaninen hiili-vesi-jakautumiskerroin (K_{oc}) on kemikaalin maan orgaanisen hiilen fraktiossa olevan pitoisuuden ja vedessä tasapainotilassa olevan pitoisuuden välinen suhde.

Oktanoli-vesi-jakautumiskerroin (K_{ow}) on kemikaalin n-oktanoliliukoisuuden ja vesiliukoisuuden suhde tasapainotilassa, josta käytetään myös merkintää P_{ow}. Logaritmia K_{ow} (log K_{ow}) käytetään ilmaisemaan kemikaalin biokertyvyyspotentiaalia vesieliöissä.

▼M4

Kertymä- eli altistumisvaihe on aika, jona testiorganismit altistetaan testattavalle kemikaalille.

Maan kertymävakio (k_s) on numeerinen arvo, joka määrittää kuinka nopeasti testiaineen pitoisuus nousee testiorganismissa tai sen pinnalla, koska testiainetta kertyy maafaasista. k_s ilmaistaan grammoina maata kilossa matoa, d^{-1}.

Poistumavaihe alkaa, kun testiorganismit on siirretty kontaminoituneesta väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole testattavaa ainetta. Poistumavaiheen aikana tutkitaan kyseisen testikemikaalin (netto)poistumaa testiorganismeista.

Poistumavakio (k_e) on numeerinen arvo, joka kuvaa testattavan aineen pitoisuuden alenemisen nopeutta testiorganismissa tai sen pinnalla, kun testiorganismit on siirretty testattavaa ainetta sisältävästä väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole kyseistä ainetta. k_e:n laatu on $päivää^{-1}$).

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

Lisäys 2

Kertymä- ja poistumaparametrien laskeminen

Biokertymistestin tärkein tutkittava ominaisuus on biokertyvyystekijä BAF. Mitattu BAF voidaan laskea jakamalla pitoisuus testiorganismissa C_a pitoisuudella maassa C_s tasapainotilassa. Jos tasapainotilaa ei saavuteta kertymävaiheessa, BAF_K lasketaan nopeusvakioista eikä BAFss-arvosta. On kuitenkin ilmoitettava, perustuuko BAF tasapainotilan pitoisuuksiin vai nopeusvakioihin.

Kineettinen biokertyvyystekijä (BAF_K), maan kertymävakio (k_s) ja poistumavakio (k_e) lasketaan yleensä tietokoneella käyttäen epälineaarisia parametrien arviointimenetelmiä kohdassa (68) kuvattujen mallien perusteella. Kun tietokoneelle syötetään sarja peräkkäisiä aikapitoisuustuloksia ja mallikaavat:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö 1]}$$

tai

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[yhtälö 2]}$$

jossa

C_a = kemikaalin pitoisuus madoissa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

k_s = kertymävakio kudoksessa [grammaa maata kilossa matoa, d-1]

C_s = kemikaalin pitoisuus maassa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

k_e = poistumavakio [d-1]

t_c = aika kertymävaiheen lopussa

nämä ohjelmat laskevat BAF_K-, k_s- ja k_e-arvot.

Kun taustapitoisuus ei-altistuneissa madoissa esim päivänä 0 poikkeaa merkittävästi nollasta (näin voi käydä esim. metallien kanssa), taustapitoisuus ($C_{a,0}$) on sisällytettävä näihin yhtälöihin seuraavasti:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö 3]}$$

ja

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[yhtälö 4]}$$

Jos massaa havaitaan testikemikaalin pitoisuuden merkittävää laskua kertymävaiheen aikana, voidaan käyttää seuraavia malleja, esim. (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{[yhtälö 5]}$$

▼**M4**

jossa

C_s = kemikaalin pitoisuus maassa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

k_0 = hajoamisen nopeusvakio maassa [d-1]

C_0 = kemikaalin alkuperäinen pitoisuus maassa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[yhtälö 7]}$$

jossa

C_a = kemikaalin pitoisuus madoissa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

k_s = kertymävakio kudoksessa [grammaa maata kilossa matoa, d-1]

k_0 = hajoamisen nopeusvakio maassa [d-1]

k_e = poistumavakio [d-1]

t_c = aika kertymävaiheen lopussa.

Kun tasapainotila saavutetaan kertymävaiheessa (eli $t = \infty$), yhtälö 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö 1]}$$

voidaan muuttaa seuraavasti:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

tai

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[yhtälö 8]}$$

Tällöin k_s/k_e x C_s lähenee testiaineen pitoisuutta matokudoksissa tasapainotilassa ($C_{a,ss}$).

Eliöstön-maaperän kertyvyyskerroin (BSAF) voidaan laskea seuraavasti:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[yhtälö 9]}$$

jossa f_{oc} on maan orgaanisen hiilen fraktio ja f_{lip} on matojen rasvan fraktio, joista kumpikin määritetään mieluiten testissä otetuista näytteistä. Ne perustuvat kuivapainoon tai märkäpainoon.

Poistumakinetiikkaa voidaan mallintaa poistumavaiheen tietojen avulla ja soveltamalla seuraavaa malliyhtälöä ja tietokonepohjaisia epälineaarisia parametrien arviointimenetelmiä. Jos ajan suhteen esitetyt datapisteet viittaavat testiaineen pitoisuuden jatkuvaan eksponentiaaliseen laskuun eläimissä, poistumisen ajallista esiintymistä voidaan kuvata yhden lohkon mallilla (yhtälö 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[yhtälö 10]}$$

▼**M4**

Toisinaan poistumisprosessit vaikuttavat kaksivaiheisilta: C_a laskee nopeasti alkuvaiheissa, mutta poistumisen myöhemmissä vaiheissa testattavat aineet poistuvat hitaammin, esim. (27) (68). Nämä kaksi vaihetta voidaan tulkita olettamalla, että organismissa on kaksi eri lohkoa, joista testattava aine poistuu eri nopeuksilla. Tällöin on tutustuttava asiaa käsittelevään kirjallisuuteen, esim. (38) (39) (40) (78).

Edellä annettuja malliyhtälöitä käyttämällä voidaan laskea myös kineettiset parametrit (k_s ja k_e) yhdellä kertaa soveltamalla ensimmäisen asteen kineettistä mallia samanaikaisesti kaikkiin kertymä- ja poistumavaiheen tietoihin. Tällaisen kertymä- ja poistumavakioiden yhdistetyn laskennan kuvaus on viitteissä (40), (72) ja (69).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad \text{[yhtälö 11]}$$

Huomautus: Kun kertymä- ja poistumaparametrit estimoidaan samanaikaisesti yhdistetyistä kertymä- ja poistumatiedoista, yhtälön 11 ”m” on kuvaaja, joka sallii tietokoneohjelman määrittää yhtälön alaehdot niitä vastaavan vaiheen datajoukkoihin ja tehdä arvioinnin oikein (m = 1 kertymävaiheelle, m = 2 poistumavaiheelle).

Siitä huolimatta malliyhtälöiden käytössä on noudatettava varovaisuutta varsinkin, kun testikemikaalin biologisessa hyötyosuudessa tai (bio)hajoamisessa tapahtuu muutoksia testin aikana (ks. esim. (79)).

▼M4

Lisäys 3

ESIMERKKEJÄ BIOKERTYVYYSTESTIEN AIKATAULUISTA

Testi lieroilla

a) Kertymävaiheessa 8 näytteenottopäivää kineettisten tietojen laskentaa varten

Päivä	Toiminnot
– 6	Valmistellun maa-aineksen sopeuttaminen 48 tunnin ajan
– 4	Testikemikaaliliuoksen lisääminen maafraktioon, mahdollisen liuottimen haihdutus, maan ainesosien sekoitus, maan jakaminen testiastioihin, testiolosuhteiden vakauttaminen 4 päivän ajan (3 viikkoa, jos maahan lisätään metallia)
– 3 – – 1	Testiorganismien erottaminen viljelmästä totuttautumista varten, maan ainesosien valmistelu ja kostutus
0	Kosteuden ja maan pH-arvon mittaus, maanäytteiden ottaminen käsitellyistä astioista ja liuotinkontrolleista testikemikaalien pitoisuuden määrittämistä varten, ravintoannoksen lisääminen, matojen punnitus ja satunnaistettu jakaminen testiastioihin, riittävän matojen alanäytteiden säilyttäminen analyyttisten tausta-arvojen, märkä- ja kuivapainon sekä rasvapitoisuuden määrittämistä varten, kaikkien testiastioiden punnitus maan kosteuden kontrollointia varten, tuloilman kontrollointi, jos käytössä on suljettu testijärjestelmä
1	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytymisen ja lämpötilan kirjaaminen, maa- ja matonäytteiden ottaminen testattavan aineen pitoisuuden määrittämistä varten
2	Sama kuin päivänä 1
3	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytyminen ja lämpötila
4	Sama kuin päivänä 1
5–6	Sama kuin päivänä 3
7	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
8–9	Sama kuin päivänä 3
10	Sama kuin päivänä 1
11–13	Sama kuin päivänä 3
14	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
15–16	Sama kuin päivänä 3
17	Sama kuin päivänä 1
18–20	Sama kuin päivänä 3

▼**M4**

Päivä	Toiminnot
21	Sama kuin päivänä 1, lämpötilan ja maan pH-arvon mittaaminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen, kertymävaiheen loppu, matojen siirtäminen jäljellä olevista altistetuista rinnakkaisnäytteistä poistumavaihetta varten astioihin, joissa on puhdasta maata (ei suolen tyhjennystä), maa- ja matonäytteet liuotinkontrolleista
	Esialtistustoimet (tasapainovaihe) on ajoitettava testikemikaalin ominaisuuksien mukaan.
	Päivänä 3 kuvatut toimet tehdään päivittäin (vähintään kaikkina arkipäivinä).

b) Poistumavaihe

Päivä	Toiminnot
– 6	Maan ainesosien valmistelu ja kostutus, valmistellun maa-aineksen sopeuttaminen 48 tunnin ajan
– 4	Maan ainesosien sekoitus, maan jakaminen testiastioihin, inkubaatio testiolosuhteissa 4 päivän ajan
0 (kertymävaiheen loppu)	Lämpötilan ja maan pH-arvon mittaus, matojen punnitus ja satunnaistettu jakaminen testiastioihin, ravintoannoksen lisääminen, matojen siirtäminen jäljellä olevista altistetuista rinnakkaisnäytteistä astioihin, joissa on puhdasta maata, maa- ja matonäytteet 4–6 tunnin kuluttua testikemikaalin pitoisuuden määrittämistä varten
1	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytymisen ja lämpötilan kirjaaminen, maa- ja matonäytteiden ottaminen testikemikaalin pitoisuuden määrittämistä varten
2	Sama kuin päivänä 1
3	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytyminen ja lämpötila
4	Sama kuin päivänä 1
5–6	Sama kuin päivänä 3
7	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
8–9	Sama kuin päivänä 3
10	Sama kuin päivänä 1
11–13	Sama kuin päivänä 3
14	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
15–16	Sama kuin päivänä 3
17	Sama kuin päivänä 1

▼**M4**

Päivä	Toiminnot
18–20	Sama kuin päivänä 3
21	Sama kuin päivänä 1, lämpötilan ja maan pH-arvon mittaus, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen, maa- ja matonäytteet liuotinkontrolleista
	Maa valmistellaan ennen poistumavaihetta samoin kuin ennen kertymävaihetta
	Päivänä 3 kuvatut toimet tehdään päivittäin (vähintään kaikkina arkipäivinä).

Testi änkyrimadoilla

a) Kertymävaiheessa 8 näytteenottopäivää kineettisten tietojen laskentaa varten

Päivä	Toiminnot
– 6	Valmistellun maa-aineksen sopeuttaminen 48 tunnin ajan
– 4	Testikemikaaliliuoksen lisääminen maafraktioon, mahdollisen liuottimen haihdutus, maan ainesosien sekoitus, maan jakaminen testiastioihin, testiolosuhteiden vakauttaminen 4 päivän ajan (3 viikkoa, jos maahan lisätään metallia)
– 3 – – 1	Testiorganismien erottaminen viljelmästä totuttautumista varten, maan ainesosien valmistelu ja kostutus
0	Kosteuden ja maan pH-arvon mittaus, maanäytteiden ottaminen käsitellyistä astioista ja liuotinkontrolleista testikemikaalien pitoisuuden määrittämistä varten, ravintoannoksen lisääminen maahan, matojen punnitus ja satunnaistettu jakaminen testiastioihin, riittävän matojen alanäytteiden säilyttäminen analyyttisten tausta-arvojen, märkä- ja kuivapainon sekä rasvapitoisuuden määrittämistä varten, kaikkien testiastioiden punnitus maan kosteuden kontrollointia varten, tuloilman kontrollointi, jos käytössä on suljettu testijärjestelmä
1	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytymisen ja lämpötilan kirjaaminen, maa- ja matonäytteiden ottaminen testattavan aineen pitoisuuden määrittämistä varten
2	Sama kuin päivänä 1
3	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytyminen ja lämpötila
4	Sama kuin päivänä 1
5–6	Sama kuin päivänä 3
7	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen maahan, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
9	Sama kuin päivänä 1
10	Sama kuin päivänä 3

▼**M4**

Päivä	Toiminnot
11	Sama kuin päivänä 1
12–13	Sama kuin päivänä 3
14	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen maahan, lämpötilan ja maan pH-arvon mittaaminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen, kertymävaiheen loppu, matojen siirtäminen jäljellä olevista altistetuista rinnakkaisnäytteistä poistumavaihetta varten astioihin, joissa on puhdasta maata (ei suolen tyhjennystä), maa- ja matonäytteet liuotinkontrolleista
	Esialtistustoimet (tasapainovaihe) on ajoitettava testikemikaalin ominaisuuksien mukaan
	Päivänä 3 kuvatut toimet tehdään päivittäin (vähintään kaikkina arkipäivinä).

▼M4

Lisäys 4

Keinomaan valmistus- ja säilytyssuosituksia

Koska tietystä lähteestä peräisin olevaa luonnonmaata ei välttämättä ole saatavana vuoden ympäri ja koska luonnonmaan sisältämät organismit ja mikrosaasteet voivat vaikuttaa testiin, tässä testissä on suositeltavaa käyttää keinomaata, joka on kuvattu tämän liitteen luvussa C.8 Myrkyllisyystutkimus madoilla (48). Useat testilajit pystyvät elämään, kasvamaan ja lisääntymään tässä keinomaassa, ja testi- ja viljelyolosuhteiden yhdenmukaisuus on mahdollisimman suuri sekä laboratorion sisällä että laboratorioiden välillä.

Maan ainesosat

Turve:	10 %	Rahkasuoturve OECD:n ohjeen 207 (48) mukaisesti
Kvartsihiekka:	70 %	Teollinen kvartsihiekka (ilmakuivattu), raekoko: yli 50 prosenttia hiukkasista on oltava 50–200 μm, mutta kaikkien hiukkasten on oltava alle ≤ 2 mm
Kaoliniittisavi:	20 %	Kaoliniittipitoisuus ≥ 30 %
Kalsiumkarbonaatti:	≤ 1 %	$CaCO_3$, jauhettu, kemiallisesti puhdas

Haluttaessa keinomaan orgaanisen hiilen pitoisuutta voidaan pienentää esimerkiksi laskemalla turpeen määrän 4–5 prosenttiin kuivamaasta ja lisäämällä hiekan määrää vastaavasti. Kun orgaanisen hiilen pitoisuus pienenee, testikemikaalin adsorboituminen maahan (orgaaniseen hiileen) saattaa heikentyä ja testikemikaalin saatavuus madoille nousta (74). On osoitettu, että *Enchytraeus albidus* ja *Eisenia fetida* täyttävät lisääntymiskriteerit, kun luonnonmaan orgaanisen hiilen pitoisuus on matala, esim. 2,7 prosenttia (33), (60). Kokemuksen mukaan sama saadaan aikaan keinomaassa käyttämällä 5 prosenttia turvetta.

Valmistelut

Maan kuivat ainesosat sekoitetaan perusteellisesti (esim. suurella laboratoriosekoittimella). Tämä tehdään noin viikko ennen testin alkua. Sekoitetun kuivamaan ainekset kostutetaan deionisoidulla vedellä vähintään 48 tuntia ennen testattavan aineen lisäämistä, jotta happamuus ehtii vakiintua. pH-määritystä varten käytetään maan ja 1 M KCl -liuoksen sekoitusta suhteessa 1:5. Jos pH-arvo ei ole vaaditulla alueella (6,0 ± 0,5), maahan lisätään riittävä määrä $CaCO_3$:ta tai valmistetaan uusi maaerä.

Keinomaan suurin mahdollinen vedensitomiskyky (WHC) määritetään standardin ISO 11268-2 (35) mukaisesti. Vähintään kaksi vuorokautta ennen testin aloittamista kuiva keinomaa kostutetaan lisäämällä deionisoitua tai synteettistä vettä, kunnes vesipitoisuus on noin puolet lopullisesta. Lopullisen vesipitoisuuden on oltava 40–60 prosenttia suurimmasta mahdollisesta vedensitomiskyvystä (WHCmax). Testin alussa esikostutettu maa jaetaan yhtä moneen erään kuin testissä käytetään pitoisuuksia ja kontrolleja, ja kosteuspitoisuus säädetään 40–60 prosenttiin WHC_{max}-arvosta testattavan aineen liuoksella ja/tai lisäämällä deionisoitua tai synteettistä vettä. Kosteuspitoisuus määritetään testin alussa ja lopussa (lämpötilassa 105 °C). Kosteuspitoisuuden on oltava optimaalinen lajeille. Kosteuspitoisuuden voi tarkistaa myös seuraavasti: kun maata puristetaan varovasti käsin, sormien välissä pitäisi näkyä pieniä vesipisaroita.

▼M4

Säilytys

Keinomaan kuivia ainesosia voidaan säilyttää huoneenlämmössä käyttöön asti. Valmistettua, esikostutettua maata voidaan säilyttää viileässä enintään kolme vuorokautta ennen testiaineen lisäämistä. Veden haihtumista on ehkäistävä. Kun maahan on lisätty testiaine, maa on käytettävä heti, ellei ole tiedossa, että tiettyä maata voidaan säilyttää ilman, että se vaikuttaa testattavan aineen toksisuuteen ja biologiseen hyötyosuuteen. Näytteitä maasta, johon testiainetta on lisätty, voidaan säilyttää kyseisen testiaineen suositelluissa säilytysolosuhteissa analyysiin saakka.

▼M4

Lisäys 5

Maalla elävien harvasukasmatojen lajit, joita suositellaan maan biokertyvyystestejä varten

Lierot

Suositeltu testilaji on *Eisenia fetida* (Savigny 1826), joka kuuluu Lumbricidae-heimoon. Vuodesta 1972 lähtien on erotettu kaksi alalajia *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* (10). Jaeniken (36) mukaan ne ovat aidosti eri lajeja. *Eisenia fetida* on helppo tunnistaa segmenttien kirkkaankeltaisista väleistä, kun taas *Eisenia andrei* on yhtenäisen tummanpunainen. Ne ovat todennäköisesti kotoisin Mustanmeren alueelta. Nykyisin ne ovat levinneet ympäri maailmaa ja etenkin ihmisen muokkaamiin elinympäristöihin, kuten tunkioihin. Kumpaakin lajia voidaan käyttää ekotoksikologisissa ja biokertyvyystesteissä.

Eisenia fetidaa ja *Eisenia andreita* myydään kaupallisesti esim. kalansyötiksi. Niiden elinaika on lyhyt verrattuna muihin *Lumbricidae*-heimon lieroihin, ja ne tulevat sukukypsiksi noin 2–3 kuukauden iässä (huoneenlämmössä). Optimaalinen lämpötila on noin 20–24 °C. Lierot elävät mieluiten kosteassa alustassa, jonka pH on lähes neutraali ja joka sisältää paljon orgaanista ainesta. Koska näitä lajeja on käytetty yleisesti standardoiduissa ekotoksikologisissa testeissä noin 25 vuoden ajan, niiden kasvattaminen on vakiintunutta (48) (77).

Kumpaakin lajia voidaan kasvattaa hyvin erilaisissa eläinjätteissä. ISO:n suosittelema kasvatusalusta (35) on hevosen- tai lehmälantaa ja turvetta suhteessa 50:50. Kasvatusalustan pH-arvon on oltava noin 6–7 (sitä säädellään kalsiumkarbonaatilla). Ionisen johtavuuden on oltava matala (alle 6 mS/cm tai suolapitoisuus alle 0,5 %) eikä kasvatusalustassa saa olla liikaa ammoniakkia tai eläinten virtsaa. Kaupallista puutarhamultaa, joka ei sisällä lisäaineita, OECD:n mukaista keinomaata (48) tai näiden kahden sekoitusta suhteessa 50:50 voidaan myös käyttää. Alustan on oltava kostea mutta ei liian märkä. Kasvatuslaatikon soveltuva koko on 10–50 litraa.

Jotta saadaan vakioikäisiä ja -painoisia matoja, viljelmä on paras aloittaa munakoteloilla. Munakoteloita saadaan lisäämällä aikuisia matoja kasvatuslaatikkoon, jossa on tuoretta substraattia. Käytännön kokemus on osoittanut, että hyvä jälkeläistuotto saavutetaan, kun matojen tiheys on noin 100 aikuista matoa substraattikiloa (märkäpaino) kohden. Aikuiset madot poistetaan 28 vuorokauden kuluttua. Munakoteloista kuoriutuneita lieroja käytetään testaukseen, kun ne ovat sukukypsiä vähintään 2 kuukauden mutta alle 12 kuukauden kuluttua.

Edellä kuvattujen lajien matoja voidaan pitää terveinä, jos ne liikkuvat alustassa mutta eivät yritä lähteä siitä pois ja lisääntyvät jatkuvasti. Hyvin hidas liikkuminen tai keltainen peräpää (*Eisenia fetida* -lajilla) viittaa substraatin ehtymiseen. Tällöin on suositeltavaa lisätä tuoretta substraattia ja/tai vähentää eläinten määrää laatikossa.

Valikoitua lisäviitemateriaalia

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1–58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1–81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49–55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180–201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1–171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. Teoksessa: Earthworm Ecology – from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. s. 331–338.

Änkyrimadot

Suositeltava laji on *Enchytraeus albidus*, Henle 1837. *Enchytraeus albidus* on nivelmatojen pääjakson harvasukasmatojen alaluokan *Enchytraeidae*-heimon suurimpia lajeja (jopa 15 mm), ja se on levinnyt ympäri maailmaa, esim. (8). *Enchytraeus albidusta* esiintyy merellisissä, limnisissä ja maaluontotyypeissä lähinnä hajoavassa orgaanisessa aineessa (levä, komposti) ja harvoin niityillä (42). Tämä laaja ekologinen sietokyky ja eräät morfologiset variaatiot viittaavat siihen, että lajista saattaa olla eri rotuja.

Enchytraeus albidusta myydään kaupallisesti kalanruoaksi. On tarkistettava, ettei viljelmä ole kontaminoitunut jollakin, yleensä pienemmällä lajilla (60). Jos kontaminaatiota ilmenee, kaikki madot on pestävä vedellä petrimaljassa. Sen jälkeen aikuiset *Enchytraeus albidus* -madot valitaan (stereomikroskoopilla) uuden viljelmän perustamista varten. Kaikki muut madot hävitetään. Näiden matojen elinikä on lyhyt, sillä kypsyyden saavuttaminen kestää 33 vuorokaudesta (18 °C:n lämpötilassa) 74 vuorokauteen (12 °C:n lämpötilassa). Testiin saa käyttää ainoastaan viljelmiä, joita on säilytetty ongelmitta laboratoriossa vähintään 5 viikkoa (yhden sukupolven).

Muut *Enchytraeus*-suvun lajit ovat myös soveltuvia, ja etenkin *Enchytraeus luxuriosus*. Tämä laji on todellinen maaeläjä, ja se on kuvattu äskettäin (65). Jos käytetään muita *Enchytraeus*-lajeja, ne on tunnistettava selvästi ja lajin valintaperusteet on raportoitava.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) -laji kuuluu samaan ryhmään kuin *Enchytraeus luxuriosus*. Sitä ei ole varmuudella todettu kentällä, vaan lajia on kuvattu vain lieroviljelmissä ja komposteissa (Römbke 2003). Siksi lajin alkuperäisiä ekologisia vaatimuksia ei tunneta. Tuoreet laboratoriotutkimukset erilaisissa maaperissä ovat kuitenkin vahvistaneet, että tällä lajilla on laaja sietokyky maan ominaisuuksille, kuten pH:lle ja koostumukselle (Jänsch *et al.* 2005). Tätä lajia on käytetty viime vuosina usein ekotoksikologisissa tutkimuksissa helpon kasvatuksen ja testauksen vuoksi (esim. Kuperman *et al.* 2003). Madot ovat kuitenkin pieniä, (3–12 mm, keskimäärin 7 mm) (Westheide & Müller 1996), joten niitä on vaikeampi käsitellä kuin *Enchytraeus albidus* -lajia. Kun tätä lajia käytetään *Enchytraeus albiduksen* sijaan, testiastia voi haluttaessa olla pienempi. Lisäksi on otettava huomioon, että tämä laji lisääntyy erittäin nopeasti. Generaatioaika on alle 20 vuorokautta lämpötilassa 20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999), ja vielä lyhyempi tätä korkeammassa lämpötilassa.

Enchytraeus albidus -lajin änkyrimatoja (sekä muita *Enchytraeus*-lajeja) voidaan kasvattaa suurissa muovilaatikoissa (esim. 30 × 60 × 10 cm tai 20 × 12 × 8 cm pienikokoisille madoille), joissa on keinomaan ja kaupallisen, kontaminoitumattoman ja lisäaineettoman puutarhamullan seosta. Kompostiainesta on vältettävä, sillä se voi sisältää myrkyllisiä kemikaaleja, kuten raskasmetalleja. Kasvatusmaasta on poistettava eläimistö pakastamalla se kolme kertaa ennen käyttöä. Puhdasta keinomaata voidaan myös käyttää, mutta lisääntymisnopeus voi olla hitaampi kuin sekoitetuissa substraateissa. Substraatin pH-arvon on oltava 6,0 ± 0,5. Viljelmää pidetään inkubaattorissa lämpötilassa 15 ± 2 °C ilman valoa. Yli 23 °C:n lämpötilaa on vältettävä. Keino- tai luonnonmaan on oltava kosteaa, mutta ei märkää. Kun maata painetaan kevyesti kädellä, näkyviin pitäisi tulla vain pieniä vesipisaroita. Hapettomia olosuhteita on aina vältettävä (jos esimerkiksi käytetään kantta, kannessa on oltava tarpeeksi reikiä, jotta ilmanvaihto on riittävää). Kasvatusmaa on ilmastettava sekoittamalla sitä varovasti kerran viikossa.

▼M4

Madot ruokitaan vähintään kerran viikossa ruokahalun mukaisesti kaurahiutaleilla, jotka pannaan koloon maanpinnan alle ja peitetään maalla. Jos astiassa on jäljellä edellisellä ruokintakerralla annettua ruokaa, ruoanmäärää säädetään vastaavasti. Jos jäljellä olevassa ravinnossa kasvaa sientä, vaihda kaurahiutaleet uusiin. Lisääntymistä voi stimuloida antamalla kaurahiutaleiden lisäksi kaupallista vitaminoitua proteiinijauhetta kahden viikon välein. Kolmen kuukauden kuluttua eläimet siirretään vasta valmistettuun viljelmään tai kasvatusalustaan. Kaurahiutaleet, joita säilytetään suljetuissa astioissa, on käsiteltävä autoklaavissa tai kuumennettava ennen käyttöä, jotta infektiot ja jauhopunkit (esim. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) tai petopunkit (esim. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina) voidaan välttää. Ruoka jauhetaan desinfioinnin jälkeen, jotta se on helppo levittää maan pinnalle. Muita mahdollisia ravinnonlähteitä ovat leivontahiiva tai TetraMin®-kalanruoka.

Kasvatusolosuhteet ovat yleensä riittävän hyvät, jos madot eivät yritä poistua substraatista, madot liikkuvat maassa nopeasti, matojen ulkopinta on kiiltävä ja siihen on tarttunut maahiukkasia, madot ovat vaaleita ja näkyvissä on eri ikäisiä matoja. Matoja voidaan pitää terveinä, jos ne lisääntyvät jatkuvasti.

Valikoitua lisäviitemateriaalia

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117–126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51–83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651–656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607–616.

Westheide W ja Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W ja Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.